



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA DE MEMBRANA
EXTERNA DE *Leptospira interrogans* NA LEVEDURA *Pichia pastoris***

ROBSON GRANDO DOSSA

MONOGRAFIA DE CONCLUSÃO DE CURSO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Campus Universitário s/nº
Caixa-postal 354 CEP 96010-900
Pelotas – RS – Brasil

2006

ROBSON GRANDO DOSSA

**CLONAGEM E EXPRESSÃO DE UMA PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA DE
Leptospira interrogans NA LEVEDURA *Pichia Pastoris***

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pelotas como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, na área de Biotecnologia, sob orientação do Prof. Dr. Odir A. Dellagostin.

**PELOTAS
Rio Grande do Sul – Brasil
Agosto de 2006**

Banca examinadora:

Prof. Dr. Odir Antônio Dellagostin

Prof. Dr. Fábio Leivas Leite

Drda. Fabiana Kömmling Seixas

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Adroaldo e Oneide e as
minhas irmãs Angela e Débora.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade de realizar o curso de Ciências Biológicas.

Ao professor Odir A. Dellagostin pela sua orientação, pela confiança em minha capacidade, pela sua preocupação, dedicação e amizade, e pelo exemplo como pesquisador e professor.

A minha co-orientadora Fabiana Kömmling Seixas pela paciência, compreensão e acima de tudo pela amizade.

Aos meus pais Adroaldo e Oneide e as minhas irmãs Angela e Débora pela força e incentivo nas horas mais difíceis, apesar da nossa grande distância e saudades.

Aos amigos e colegas de laboratório de Biologia molecular, André A. Grassman, Ângela Moreira, Daine D. Hartwig, Éverton F. Silva, Gustavo M. Cerqueira, Michel Fagundes, Michele Santos, Samuel Ribeiro, Sandra D. Jouglard, Sibebe Borsuk, Simone Simionatto, Tessália D. Luece, Vanessa Galli, Vanusa P. da Hora. Também os integrantes do “grupo *Pichia pastoris*”, Andréia, Carina, professor Fabio, Fabrício, Professor Gil, João Rodrigo, Luana, Fabiana, Luciano e os demais colegas do Centro de Biotecnologia e do curso de Ciência Biológicas agradeço pelo companheirismo, amizade, incentivo e auxílio.

A FAPERGS e ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.

RESUMO

DOSSA, Robson Grando. Universidade Federal de Pelotas. **Clonagem e Expressão de uma Proteína de Membrana Externa de *Leptospira interrogans* na levedura *Pichia pastoris***. 2006. 61f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso). Professor Orientador: Odir Antônio Dellagostin. Universidade Federal de Pelotas.

A leptospirose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Leptospira*, de curso agudo ou crônico, a qual afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos. Esta zoonose possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo de forma endêmica em todo o mundo e atualmente é reconhecida como uma doença emergente. Infecções normalmente são contraídas pela exposição à água, alimento ou solo contaminado com a urina de animais infectados. Os principais carreadores da *Leptospira* para o homem incluem roedores, bovinos, caninos, eqüinos e suínos. Os prejuízos em termos de saúde pública e as perdas econômicas causadas por tal zoonose justificam o uso de vacinas contra leptospirose em humanos e em animais. Assim o desenvolvimento de novas estratégias para a prevenção da leptospirose se faz necessário. A procura por antígenos adequados para vacinas e que possam servir como reagentes para diagnóstico de leptospirose levou a identificação de uma nova família de proteínas relacionadas à superfície externa da leptospira, denominadas “*Leptospiral Immunoglobulin-like proteins*” (LigA e LigB). Dados preliminares indicam seu potencial no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose, pois são proteínas de membrana externa presentes em todos os sorovares de leptospiras patogênicas, cuja expressão ocorre somente durante a infecção. A utilização da levedura *Pichia pastoris* como um sistema de expressão apresenta inúmeros benefícios, pois combina as vantagens dos sistemas de expressão de procariotos (expressão em altos níveis, fácil aumento de escala e meios de crescimento baratos) e de eucariotos (capacidade de realizar modificações pós-traducionais). A utilização desta levedura para a produção de proteínas heterólogas tem se mostrado bastante satisfatória, permitindo a produção de inúmeras enzimas, proteínas reguladores, antígenos, anticorpos e até mesmo outras proteínas de membrana. Assim, o objetivo deste trabalho foi clonar e expressar na levedura *P. pastoris* a região não idêntica da proteína LigA de *Leptospira interrogans*.

Palavras-chaves: *Leptospira*, leptospirose, *Pichia pastoris*, clonagem, expressão.

ABSTRACT

DOSSA, Robson Grando. Universidade Federal de Pelotas. **Cloning and expression of an outer membrane protein from *Leptospira interrogans* using the yeast *Pichia pastoris***. 2006. 61f. Supervisor: Odir Antônio Dellagostin. Universidade Federal de Pelotas.

Leptospirosis is an infectious disease caused by bacteria belonging to *Leptospira* genus. The disease may follow an acute or chronic stage infecting several species of domestic livestock, wild animals or humans. This zoonosis is endemic worldwide and is recognized as an emerging disease. Infection normally results from exposure to contaminated water, food or soil, which had contact with the urine of infected animals. The main carrier species responsible for transmission of *Leptospira* to humans includes rodents, bovines, dogs, horses and swine. Public health concerns and economic losses strongly justify the use of vaccines for the control of leptospirosis within animal and human populations. Thus, the development of new strategies for prevention of leptospirosis is needed. The search for new useful antigens to be used as vaccines or as diagnostic reagents lead to the identification of a new family of proteins related to the outer membrane of leptospira, named Leptospiral immunoglobulin-like proteins (LigA and LigB). Preliminary data indicate their potential in the development of recombinant vaccines against leptospirosis. They are outer membrane proteins known to be present in all the serovars of pathogenic *Leptospira* and the expression is only detected during infection. The use of the yeast *Pichia pastoris* as an expression system presents several benefits once it combines the advantages of prokaryotic expression systems (high level of expression, possibility for high-throughput modulation, cheap platform for protein expression) as well as that from eukaryotic expression systems (post-translational modifications). The use of this yeast for the production of heterologous proteins has been shown to be highly satisfactory, allowing for the production of a diverse range of enzymes, regulator proteins, antigens, antibodies and also other surface proteins. The main goal of this project was to clone and express, using *Pichia pastoris*, the non-identical region of LigA protein from *Leptospira interrogans*.

Keywords: *Lepstospira*, Leptospirosis, *Pichia pastoris*, cloning, expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%, dos produtos da amplificação do gene <i>ligAni</i> por PCR.	39
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 0,8% do gene <i>ligAni</i> , digerido com as endonucleases de restrição <i>Eco RI</i> e <i>Kpn I</i> e purificado.....	41
Figura 3 - Detecção rápida de colônias com o plasmídio <i>TOPO/ligAni</i> com fenol:clorofórmio.....	42
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com os produto da extração do plasmídio <i>TOPO/ligAni</i>	42
Figura 5 - Gel de agarose 0,8% da digestão do plasmídio <i>TOPO/ligAni</i>	43
Figura 6 - Mapa do vetor de expressão <i>pPICZ B</i>	44
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão com as endonucleases de restrição <i>EcoRI</i> e <i>KpnI</i> do vetor <i>pPICZ B</i>	45
Figura 8 - Desenho esquemático do vetor <i>pPICZ B/ligAni</i> gerado pelo software <i>VectorNTI 8.0</i> (Informax).....	45
Figura 9 - Detecção rápida de colônias com o gene <i>ligAni</i> com fenol:clorofórmio.....	46
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com a extração do plasmídios <i>pPICZ B/ligAni</i>	46
Figura 11 - Gel de agarose 0,8% das digestão com enzimas de restrição.	47
Figura 12 - Gel de agarose 0,8% da digestão do plasmídio recombinante <i>pPICZ B/ ligAni</i> com a enzima de restrição <i>SacI</i>	47
Figura 13 - Gel de agarose 0,8% do “ <i>PCR screening</i> ”	48
Figura 14 - Gel de poliacrilamida a 15% corado com azul de Coomassie mostrando a expressão da proteína <i>LigAni</i>	49
Figura 15 - Western blot” de transformantes expressando a proteína <i>LigAni</i> ..	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programa utilizado na reação de PCR.....	28
Tabela 2 - Descrição dos componentes utilizados na reação de PCR.....	28
Tabela 3 - Descrição dos componentes utilizados na reação de PCR.....	36
Tabela 4 - Componentes do Gel de Separação (15%) de Poliacrilamida	37
Tabela 5 - Componentes do Gel de Empilhamento (5%) de Poliacrilamida	38

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

μFD: microfarad

μg: micrograma

μl: microlitro

μm: micrômetro

C° : graus Celsius

BMGY : “Buffered Glycerol-complex Medium”

BMMY : “Buffered Metanol-complex Medium”

CIP: “calf intestinal phosphatase”

DNA: 2' – desoxirribonucleotídeo 5' - trifosfato

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

ELISA: *Enzime-linked immunossorbent assay*

EMJH: Meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris

g/l: gramas por litro

h: hora

kb: quilo bases

kDa: quilo Dalton

]LB: Meio Luria-Bertani

M: concentração molar

MAT: teste de aglutinação microcópica

mg: miligrama

min: minuto

ml: mililitro

mM: concentração milimolar

ng: nanograma

OD: densidade óptica

pb: pares de bases

PBS-T: tampão fosfato salino acrescido de 0,05% de Tween 20

PCR: reação em cadeia da polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

rpm: rotações por minuto

s: segundos

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TBE: tampão tris-borato-EDTA

TE: tampão tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina

UV: luz ultra violeta

X: vezes

YNB : “Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate”

YPDS: Yest Extract Dextrose Midium + sorbitol

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	14
1.1 – A leptospirose	14
1.1.1 – Agente etiológico	14
1.1.1.1 Taxonomia	14
1.1.1.2 Morfologia e biologia	15
1.1.1.3 Biologia molecular	16
1.1.2 – Epidemiologia	16
1.1.3 – Apresentação clínica.....	18
1.1.4 – Diagnóstico	18
1.1.5 – Tratamento e prevenção.....	19
1.1.6 – Vacinas atuais	20
1.2 – Vacinas	21
1.2.1 – Agente etiológico	21
1.2.2 – Epidemiologia	21
1.3 – Proteínas Lig	23
1.3.1 – Como potencial diagnóstico.....	23
1.3.2 – Como potencial vacinógeno.....	23
1.4 – <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expressão	24
1.5 – Objetivos	26
1.5.1 – Objetivo Geral.....	26
1.5.2 – Objetivos específicos	26
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
2.1 – Cepas, cultivo e extração de DNA	27
2.2 – Obtenção e preparo do gene <i>ligAni</i>	27
2.2.1 – Síntese dos <i>primers</i>	27
2.2.2 – Reação em Cadeia da Polimerase	27
2.2.3 – Purificação dos produtos de PCR.....	29
2.2.4 – Digestão do gene <i>ligAni</i>	29
2.3 – Clonagem do gene <i>ligAni</i> sistema TOPO TA.	29
2.3.1 – Ligaç�o do gene <i>ligAni</i> no vetor pCR 2.1.....	29
2.3.2 – Preparo de c�lulas eletrocompetentes de <i>E. coli</i>	30
2.3.3 – Transforma�o em <i>E. coli</i>	30
2.3.4 – Sele�o dos clones recombinantes em <i>E. coli</i>	31
2.3.5 – Extra�o de DNA plasmidial de <i>E. coli</i>	31
2.3.6 – Digest�o do TOPO/ <i>ligAni</i>	32
2.3.7 – Purifica�o do gene <i>ligAni</i> de gel de agarose.....	32
2.4 – Preparo do vetor pPICZ B.....	33
2.5 – Liga�o do gene <i>ligAni</i> ao vetor de express�o.....	33
2.6 – Preparo do plasm�dio pPICZ B/ <i>ligAni</i>	34
2.6.1 – Obten�o do plasm�dio pPICZ B/ <i>ligAni</i>	34
2.6.2 – Lineariza�o e concentra�o do plasm�dio pPICZ B/ <i>ligAni</i>	34
2.7 – Obten�o de clones recombinantes em <i>P. pastoris</i>	34
2.7.1 – C�lulas eletrocompetentes de <i>P. pastoris</i>	34
2.7.2 – Transforma�o em <i>P. pastoris</i>	35
2.7.3 – Sele�o para confirma�o dos clones recombinantes.....	35
2.8 – Obten�o de clones recombinantes em <i>P. pastoris</i>	36

2.8.1 – Pré-inóculo e indução	36
2.8.2 – Preparo das amostras para análise das proteínas.....	37
2.8.3 – Análise das proteínas por SDS-PAGE.....	37
2.8.4 – Análise das proteínas por Western blot	38
3 – RESULTADOS	40
3.1 – Obtenção e preparo do gene <i>ligAni</i>	40
3.1.1 – Amplificação do gene <i>ligAni</i>	40
3.1.2 – Digestão e purificação do gene <i>ligAni</i>	40
3.2 – Clonagem do gene <i>ligAni</i> no sistema TOPO TA	41
3.3 – Preparo do Vetor pPicZ B	43
3.4 – Construção do vetor de expressão ou do plasmído pPICZ B/ <i>ligAni</i>	45
3.5 – Transformação em <i>Pichia pastoris</i> KM 71.....	48
3.6 – Expressão das proteínas recombinantes	49
3.7 – Western blot da proteína LigAni	49
4 - DISCUSSÃO	51
5 - CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 A leptospirose

A leptospirose é uma doença infecciosa, causada por bactérias do gênero *Leptospira*, de curso agudo ou crônico que afeta diversas espécies de animais domésticos, silvestres e os seres humanos (LANGONI, 1999). Esta zoonose possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo de forma endêmica em todo o mundo, e vem sendo reconhecida atualmente como uma doença emergente (KO *et al.*, 1999; LEVETT, 2001; McBRIDE *et al.*, 2005). Dentro das diferentes espécies, encontram-se sorovares antigenicamente relacionados, que constituem os sorogrupos. Aproximadamente 260 sorovares já foram descritos, distribuídos em 29 sorogrupos (FAINE *et al.*, 1999). Infecções normalmente são contraídas pela exposição à água, comida ou solo contaminado com a urina de animais infectados (LEVETT, 2001). Os principais carreadores da *Leptospira* para o homem incluem roedores, bovinos, caninos, eqüinos e suínos (GOLDSTEIN & CHARON, 1990).

Os prejuízos em termos de saúde pública e as perdas econômicas causadas por tal zoonose, justificam o uso de vacinas contra leptospirose em humanos ou em população animal com risco (LEVETT, 2001).

1.1.1 Agente Etiológico

1.1.1.1 Taxonomia

O gênero *Leptospira* é um dos componentes da família Leptospiraceae, ordem Spirochaetales, onde estão reunidos os microrganismos com morfologia filamentosa, espiralados (FAINE *et al.* 1999). Antes do ano de 1989, o gênero *Leptospira* era dividido em duas espécies *Leptospira interrogans* (patogênicas) e *Leptospira biflexa* (saprófitas), porém esta divisão era baseada apenas em critérios antigênicos. Atualmente, estudos de características genéticas têm conduzido à várias espécies dentro de *L. interrogans* lato sensu: *L. interrogans stricto sensu*; *santarosa*; *weillii*; *inadai*; *borgpetersenii*; *kirschnerii*; *meyeri* e *noguchii* (patogênicas) e *L. biflexa stricto sensu*: *L. fainei*, *L. alexandri*, *L. meyeri*, *L. wolbochii* (saprófitas) (RAMADAS *et al.*, 1992). A diferenciação em espécie apóia-se nas características de crescimento em meios de cultura (LEVETT, 2001).

No ponto de vista taxonômico, este gênero é bastante diverso, pois suas características antigênicas decorrem de antígenos de parede, com natureza lipoprotéica (lipopolissacarídeo), os quais apresentam inúmeras mudanças na sua composição (ZUENER *et al.*, 2000). Classificações por absorção cruzada com antígenos heterólogos subdivide *Leptospira spp.* em mais de 260 sorovares, os quais com base em relatos antigênicos são reagrupados em sorogrupos (FAINE *et al.*, 1999).

1.1.1.2 Morfologia e biologia

As leptospiros são espiroquetas aeróbios obrigatórias, possuem uma alta mobilidade devido a dois filamentos axiais (flagelos periplasmático) como inserções polares são localizados no espaço periplásmico. Seu tamanho é de aproximadamente 0,1 a 0,2 µm de diâmetro e 6 a 20 µm de comprimento, com uma curvatura em forma de gancho em uma ou nas duas extremidades (daí o nome *interrogans*). Evidenciam-se bem por métodos de coloração com prata, porém o método de escolha para o exame bacteriológico é a microscopia de campo escuro (FAINE *et al.*, 1982). A *L. interrogans* tem uma estrutura de membrana dupla, comum a outras espiroquetas, na quais a membrana citoplasmática e a parede celular de peptidoglicano estão fortemente associadas e são revestidas por uma outra membrana externa. Os lipopolissacarídeos têm a composição similar a outras bactérias Gram negativas, porém com baixa atividade endotóxica (FAINE *et al.*, 1999; LEVETT, 2001). Morfologicamente todas as leptospiros são indistinguíveis. A morfologia particular dos isolados pode variar nos cultivos *in vitro*, nas pode ser recuperada com passagens em hamsters (ELLIS *et al.*, 1983)

A temperatura ideal para o seu crescimento está entre 28 a 30°C, produzem catalase e oxidase, seu crescimento é lento, com o seu tempo de geração de aproximadamente 12 horas. Crescem em meio enriquecidos com vitaminas (principalmente B2 e B12), com ácidos graxos de cadeias longas (utilizados como fonte de carbono e metabolizados por β-oxidação) e sais de amônia (FAINE *et al.*, 1999).

Em condições naturais fora do hospedeiro as espécies patogênicas, ao contrário das saprófitas, não se multiplicam, mas sobrevivem no lodo ou no solo

úmido, com o pH é ligeiramente alcalino (7,2 a 7,4), com uma baixa salinidade e na ausência de radiações ultravioletas.

Além das radiações UV, os sorovares patogênicos também apresentam sensibilidade a desinfetantes comuns e aos antissépticos (LANGONI, 1999)

1.1.1.3 Biologia molecular

O seu material genético é dividido em dois cromossomos circulares, sendo um maior de 4.279 kb (cromossomo I) e outro menor com 350 kb (cromossomo II) (REN *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2004). Este último não pode ser considerado um plasmídeo. Estes dados foram revelados com o seqüenciamento do genoma do isolado *L. interrogans* Icterohaemorrhagiae sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) (NASCIMENTO *et al.*, 2004), obtido de um paciente com leptospirose severa durante um surto epidêmico em 1996 (KO *et al.*, 1999).

1.1.2 Epidemiologia

Em países desenvolvidos a doença está comumente associada à prática de atividades ocupacionais, recreacionais e esportes ao ar livre, como, por exemplo, natação, canoagem, *rafting*, ecoturismo, o triatlo. Enquanto que nos países em desenvolvimento sua incidência é maior ocorrendo principalmente devido à falta de infra-estrutura de saneamento básico e pelo aumento desordenado da população e das habitações na periferia das grandes cidades, onde se encontram criadouros de roedores e focos de leptospirose. Sendo sazonal (verão e outono) nos países temperados, e acompanha a precipitação pluviométrica nos países tropicais (LEVETT, 2001).

O agente infectante da leptospirose é transmitido de um mamífero infectado para outro, através do contato direto ou indireto com a urina de animais infectados (LEVETT, 2001). Os principais carreadores da *Leptospira* para o homem incluem roedores, bovinos, caninos, eqüinos e suínos (GOLDSTEIN & CHARON, 1990), porém, animais silvestres também são potencialmente capazes de transmitir a doença (BHARAWAJ, 2004). A contaminação costuma ocorrer por contato direto à urina de animais portadores, ou através de solo ou água contaminada.

A porta de entrada para as leptospirosas invadirem o organismo dos hospedeiros vertebrados, são pele lesada ou membranas mucosa íntegra (BINDE &

MERMEL, 1998). Após a penetração percorre as vias linfáticas e sangüíneas atingindo o fígado, onde se multiplicam por aproximadamente uma semana; segue-se então a fase de leptospiremia com estágio febril e subsequente produção de anticorpos, que facilita eliminação de leptospiras dos tecidos por fagocitose (SULLIVAN, 1974). Na urina, há presença de anticorpos específicos contra a leptospiras, mas não de fagócitos, o que permite a sobrevivência e multiplicação desses microrganismos nos túbulos contorcidos renais (SULLIVAN 1974). Um animal infectado pode permanecer assintomático, abrigando em seus rins e eliminando organismos viáveis em sua urina por toda a vida. (FAINE *et al.* 1999).

Os diferentes sorovares circulantes produzem uma grande diversidade de situações de exposição, reservatórios e quadros clínicos. Os ratos e outros roedores são considerados os principais reservatórios e agentes disseminadores da doença. Dentre roedores domésticos (*Rattus norvegicus*, *R. rattus* e *Mus musculus*), grande importância deve se dispensar ao *R. norvegicus* (rato de esgoto), considerado o principal reservatório de leptospiras na zona urbana (LANGONI, 1999) e portador clássico da *L. Icterohaemorrhagiae*, considerado o sorogrupo mais patogênico ao homem (VASCONCELLOS *et al.*, 1999). Enquanto caninos e bovinos são os principais reservatórios de *L. canicola* e *L. harjo*, dominantes no meio rural.

O homem é considerado um hospedeiro final na disseminação de leptospirose, ainda que prolongados leptospirúria sejam uma constante na leptospirose humana, o “status” de portador renal tem levado a raros exemplos de transmissão inter-humana pela urina ou pelo contato sexual (SZALKA & BRINDER, 1974).

No Brasil a doença é endêmica e sua incidência é maior entre janeiro e abril, quando ocorrem chuvas fortes e inundações em áreas urbanas (www.saude.gov.br). O estado Rio Grande do Sul, segundo Barcelos 2003, apresenta uma alta incidência de leptospirose, com cerca de 10 casos por 100 mil habitantes, superior à média do país (3,5 casos por 100 mil habitantes). A maior parte dos casos (86%) corresponde a pessoas a pessoas do sexo masculino e residentes na zona rural (69%). O local provável de infecção, indicado pela investigação epidemiológica de casos, aponta tanto o ambiente de trabalho quanto o domicílio como principais formas de contato com o agente (BARCELOS *et al.*, 2003).

1.1.3 Apresentação clínica

Na maioria dos casos de leptospirose humana os casos são benignos e autolimitantes (LEVETT, 2001). Frequentemente, as manifestações clínicas incluem: febre, dor de cabeça, frio, mialgia, dor abdominal e sufusão da conjuntiva (FARR, 1995), enquanto diarreias e vômitos podem aparecer em alguns casos (CICERONI *et al.*, 1995). Nas manifestações mais severas inclui falha renal, icterícia, hipotensão, meningite, hemorragia e/ou pneumonia hemorrágica que pode ser letal (VINETZ, 2001).

Outras doenças infecciosas que apresentam síndromes febris indiferenciadas, tais como a malária, dengue, influenza, febres virais hemorrágicas podem mimetizar a leptospirose.

Em animais, infecções por leptospira frequentemente causa fracasso renal e hepático (caninos), abortos, nascimento de fetos mortos, infertilidade (bovinos, suínos e eqüinos) uveítes (eqüinos), anemia hemolítica (ovinos e bovinos), e ocasionalmente á morte (SMYTH *et al.* 1999).

1.1.4 Diagnóstico

O diagnóstico clínico é muito pouco utilizado, pois os sintomas da doença são muito semelhantes com outras síndromes febris, e por não apresentar sinais patognomônicos, exigindo usualmente a confirmação laboratorial. O método laboratorial de escolha depende da fase evolutiva em que se encontra o paciente. Na fase aguda, durante o período febril, as leptospiras podem ser visualizadas no sangue através de exame direto ou a partir de cultura em meios apropriados ou inoculação em animais de laboratório (VASCONCELLOS *et al.*, 1998). Porém, este exame é extremamente falho, devendo ser realizado por observador experiente, onde é necessária a visualização em microscopia de campo escuro ou por coloração. No caso da utilização da técnica de campo escuro, deve-se atentar para a motilidade da espiroqueta e esta técnica não consegue diferenciar o gênero espiroqueta, e precisa-se de um técnico treinado na observação já que a sensibilidade é extremamente baixa. Sendo assim, não é considerado um teste definitivo, devendo se confirmado por outros testes (FAINE *et al.*, 1999;).

A cultura para isolados somente se torna positiva após algumas semanas, o que proporciona sempre diagnóstico retrospectivo (FAINE *et al.*, 1999).

Após a segunda semana da doença as leptospirosas podem ser visualizadas diretamente na urina, cultivadas ou inoculadas. Pelas dificuldades em sua realização, tais técnicas também não são adotadas rotineiramente. O exame de líquor e de tecidos músculo-esqueléticos, renais e hepáticos são raramente utilizados (LEVETT *et al.*, 2001).

O método mais consagrado de diagnóstico é a soroaglutina microscópica (MAT) a técnica consiste na aglutinação das leptospirosas vivas ou formalizadas pelo soro do homem ou de animais. Recomenda-se a realização de pelo menos dois exames, um no início e outro a partir da quarta semana de doença (FAINE *et al.*, 1999). Entretanto, esta técnica possui um alto custo de manutenção de uma bateria de leptospirosas, e os pacientes podem vir a óbito antes que a soroconversão ocorra (SMYTHE *et al.*, 2002).

1.1.5 Tratamento e prevenção

Entre as condutas terapêuticas utilizadas na leptospirose incluem-se: hidratação, correção dos distúrbios hídricos, terapia com antibióticos e diálise (quando instalada a insuficiência renal que requeira). Além dos antibióticos, outras medidas de prevenção podem ser tomadas (SÁNCHEZ 1998).

Segundo Farrar (1990) o antibiótico recomendado para prevenção da leptospirose é a doxicilina, em dose única semanal de 200 mg durante o período de exposição. Já para o tratamento, dá-se preferência à penicilina cristalina na dose diária de 2.000.000 UI, a cada seis horas, via intravenosa por sete dias. A dose diária recomendada (FARRAR, 1990) de doxicilina para tratamento da leptospirose é de 200 mg, por sete dias, sendo que seus efeitos colaterais mais comuns são sintomas gastrointestinais. Outras drogas alternativas referidas são ampicilina, amoxicilina e tetraciclina, utilizadas por sete a dez dias. Não há antibiótico capaz de reverter o dano causado em tecidos e órgãos, mas parecem atuar benéficamente na supressão da leptospirose, redução da duração e gravidade dos sintomas e até mesmo na redução da mortalidade (FAINE *et al.*, 1999). Na prática clínica, acredita-se que a terapia com antibióticos é mais efetiva se iniciada precocemente no curso da doença (FARRAR, 1990).

Além dos antibióticos, outras medidas de prevenção podem ser tomadas (SÁNCHEZ 1998). Nos países em desenvolvimento, o controle da doença depende

de medidas higiênico-sanitárias básicas e eficientes. No entanto, até o presente momento poucas medidas efetivas para prevenção da doença têm sido implantadas (McBRIDE *et al.*, 2005).

1.1.6 Vacinas atuais

Os prejuízos em termos de saúde pública e as perdas econômicas causadas pela leptospirose, justificam uso de vacinas contra leptospirose em humanos ou em populações animais de risco. Porém as vacinas disponíveis atualmente, tanto para humanos quanto para uso veterinário, possuem sucesso limitado.

As atuais vacinas são baseadas na célula inteira inativada (bacterinas), como estas vacinas não apresentam a capacidade de replicação dentro do hospedeiro, elas são bem toleradas, mas estimulam uma imunidade pouco duradoura (6 a 12 meses), necessitando repetir a vacinação para manutenção da imunidade (Ellis, 1999). A resposta imune desencadeada pelas bacterinas é contra o LPS e, portanto, restrita a sorovares antigenicamente relacionados, não conferindo proteção cruzada a outros sorovares que não estiverem presentes na vacina (PETERSEN *et al.*, 2001). A existência do grande número de sorovares patogênicos impõe uma maior limitação para a produção de uma vacina com componentes multi-sorovar (GAMBERINI *et al.*, 2005). Além disto, este tipo de vacina pode prevenir a enfermidade, mas não a leptospirose conseqüentemente à transmissão para humanos (BOLIN & ALT, 2001).

Vacinas para a prevenção da leptospirose humana vêm sendo desenvolvidas, em alguns países como Cuba (MARTINEZ *et al.*, 2000; MARTINEZ *et al.* 2004), Rússia (IKOEV *et al.*, 1999) e China (ZHUO; WANG; LAN, 1995) experimentos encontram-se em fase pré-clínica e clínica.

Inúmeros esforços estão sendo empregados no desenvolvimento de vacinas produzidas a partir de antígenos comuns a diversos sorovares ou que possa apresentar proteção cruzada (HAAKE *et al.*, 1998; SONRIER *et al.*, 2000) e que induzam uma proteção prolongada contra a grande diversidade de sorovares. Estes esforços permitiram a identificação de diversas proteínas de membrana, conservadas entre os diferentes sorovares patogênicos e, que seriam fortes candidatas ao desenvolvimento de vacinas, proporcionando proteção cruzada contra

outros sorovares patogênicos. (HAAKE *et al.* 1999; HAAKE *et al.*, 2000; HAAKE & MATSUNAGA, 2002; HAAKE *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de uma vacina multivalente protetora e de amplo espectro contra a leptospirose é indispensável. No entanto uma vacina licenciada para humanos ainda levará muito tempo (FAINE, *et al.* 1999)

1.2 Vacinas

1.2.1 Vacinas recombinantes

Nas últimas décadas, os avanços na tecnologia de vacinas permitiram a introdução de novas estratégias para a obtenção e produção de antígenos, assim como foram otimizados novas maneiras de se administrar e apresentar esses antígenos para as células do sistema imune. Essas estratégias abriram caminhos para inovações, particularmente no contexto do desenvolvimento de vacinas mais seguras, eficazes e polivalentes. Esta nova geração de vacinas, conhecidas como recombinantes, não possuem o patógeno íntegro, são altamente seguras e capazes de centralizar a resposta do sistema imune a antígenos específicos que estão relacionados com a proteção imunológica contra a doença, ou seja, não é necessário expor o sistema imune a uma série de antígenos (VAM KAMPEN, 2001)

Dentre os tipos de vacinas recombinantes existentes podemos citar: vacinas de DNA, vacinas vetorizadas e vacinas de subunidade (KREUZER & MASSEIY, 2002). As vacinas de DNA não apresentam o risco de causar a doença, e tem a vantagem de possibilitar a introdução de ambos os tipos de imunidade protetora, humoral e celular (SILVA, 1997). Estas vacinas produzem a proteína dentro da célula, estimulando assim duas classes do sistema MHC (BABIUK *et al.* 2000). Já as vacinas que utilizam BCG como vetor, oferecem vantagens como: é a vacina mais usada no mundo, pode ser ministrada em dose única após o nascimento, não sendo afetada pelos anticorpos maternos, é um importante adjuvante em experimentos animais, pode ser administrada via oral, é a vacina mais estável ao calor e seu custo de produção é baixo (STOVER *et al.*, 1991).

1.2.2 Vacinas de subunidade

Uma vacina de subunidade contém somente as proteínas do patógeno que estimulam uma resposta específica do sistema imune (BABIUK, 1999). Para sua

fabricação, primeiramente deve-se conhecer os antígenos, ou seja, proteínas imunestimulantes do patógeno (BABIUK, 1999). Posteriormente a escolha do antígeno, o DNA que o codifica deve ser isolado e inserido em um outro microrganismo, que sintetizará a proteína antigênica. O antígeno, posteriormente é purificado e inoculado no animal, onde desencadeará uma resposta imune protetora (VAN KAPEM, 1999).

Proteínas recombinantes heterólogas são produzidas tanto em organismos procariotos como em organismos eucariotos. Organismos procariotos são muito utilizados para sintetizar o antígeno recombinante de interesse, pois muitos deles já estão bem caracterizados e apresentam um baixo custo de manutenção (LIJEQVIST & STAHL, 1999). No entanto, algumas vezes, o este sistema de expressão não é recomendado, pois células procarióticas não fazem modificações pós-traducionais necessárias para a síntese de algumas proteínas, fazendo com que as proteínas recombinantes produzidas tenham uma estrutura diferente das proteínas do patógeno e por isso, não sejam capazes de induzir uma resposta protetora (BABIUK, 1999). Existem estratégias para otimizar a produção de uma proteína recombinante, como, por exemplo, promotores que aumentam os níveis da proteína sintetizada, seqüências sinalizadoras que fazem com que a proteína recombinante seja excretada pela célula facilitando a purificação do produto e técnicas que minimizam a degradação proteolítica da molécula de interesse (MARKIDES, 1996).

A tecnologia recombinante permite produzir vacinas de subunidade em grandes quantidades, tornando-a uma técnica muito mais econômica quando comparada com vacinas inativadas de componentes sub-celulares extraídos diretamente de microrganismos patogênicos (BABIUK, 1999)

As principais vantagens deste tipo de vacina são a segurança, a menor competição antigênica, já que poucos componentes imunogênicos são encontrados na vacina, a possibilidade de produzir vacinas contra proteínas comuns para vários membros da mesma família (BABIUK, 1999; ELLIS, 1999). Quando comparadas com outras vacinas recombinantes elas apresentam a vantagem de serem licenciadas pelos órgãos de regulamentação competentes (CLARK & CASSIDY-HONLEY, 2005).

Apesar de suas qualidades, freqüentemente deve-se utilizar adjuvantes com a vacina de subunidade para se obter uma resposta imune capaz de levar a proteção contra o patógeno (BABIUK, 1999).

Uma série de vacinas de subunidade baseadas no método recombinante vem sendo testadas na imunização contra vários patógenos, tanto na área médica quanto veterinária.

1.3 Proteínas Ligs

A procura por novos antígenos adequados para vacinas e como reagente para diagnóstico contra leptospirose levou a identificação de um novo grupo de proteínas, relacionado a superfície externa da leptospira, denominadas Leptospiral Immunoglobulin-like (ligA e ligB) (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; PALANIAPPAN *et al.*, 2004). LigA e ligB são idênticas na porção amino terminal, mas variam na porção carboxi terminal (PALANIAPPAN *et al.*, 2002).

Estas proteínas são *upregulated* e expressas durante a infecção (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2005), porém são pobremente expressas *in vitro*, devido provavelmente a instabilidade protéica ou ao baixo nível de transcrição, ligA e ligB, foram detectadas por RT-PCR, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PALANIAPPAN *et al.*, 2002; MATSUNAGA *et al.*, 2005). Então, as vacinas baseadas em células inteiras, provavelmente não contenham as proteínas ligs.

Os genes Ligs estão presentes nos sorovares patogênicos de *Leptospira*, mas não ocorrem em sorovares não patogênicos (PALANIAPPAN *et al.*, 2002).

1.3.1 Como potencial diagnóstico

O diagnóstico molecular mediante a amplificação por PCR das regiões codificadoras dos genes lig foi testado, tanto por PCR convencional quanto por *real-time* PCR, e em ambos os casos a detecção de leptospiras em estágio inicial de infecção foi bem sucedida (PALANIAPPAN *et al.*, 2005). A diferenciação entre animais vacinados e naturalmente infectados também foi bem sucedida, pois só se encontra anticorpos contra as proteínas ligs no soro de animais naturalmente infectados (PALANIAPPAN *et al.* 2004).

1.3.2 Como potencial vacinógeno

Dados preliminares indicam o potencial das proteínas ligs no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose, pois são proteínas de membrana

externa presente em todos os sorovares de leptospiros patogênicas e a expressão destas proteínas ocorre somente durante a infecção (MATSUNAGA *et al.*, 2003; KOIZUMI & WATANABE, 2004).

Atualmente, novos estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de comprovar o potencial protetor das proteínas lig mediante o desafio em hamsters. A proteína ligAni tem demonstrado eficiente proteção no desafio com cepa homólogas. Trabalhos de Palaniappan *et al.* (2006), obtiveram uma sobrevivência de todos os hamsters imunizados com a proteína recombinante LigA, e nenhum deles apresentou mudanças histopatológicas significantes, depois do desafio homólogo com *L. interrogans* sorovar pomona. Também ocorreu uma elevação nos títulos de anticorpos contra LigA recombinante em todos os animais vacinados. Em contraste os animais não imunizados foram susceptíveis as doses letais, e os hamsters que sobreviveram mostraram severas nefrites tubulointerciais.

1.4 *Pichia pastoris* como um sistema de expressão

Nos últimos anos, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* emergiu como um poderoso e barato sistema de expressão heteróloga para a produção de níveis altos de proteínas recombinantes (CEREGHINO & CREGG, 2000). Este sistema de expressão é único, pois combina as vantagens dos sistemas de expressão de procariotos (expressão em altos níveis, fácil aumento de escala e meios de crescimento baratos) e de eucariotos (capacidade de realizar modificações pós-traducionais) (CEREGHINO & CREGG, 2000). O aumento da preferência por este sistema particular de expressão pode ser atribuído principalmente a simplicidade da técnica necessária para a manipulação genética da *P. pastoris*, um dos sistemas experimentais mais bem caracterizados na biologia molecular; a capacidade de realizar várias modificações pós-traducionais características de eucariotos, tais como O e N-glicosilação, formação de pontes dissulfeto e processamento proteolítico; e a disponibilidade deste sistema de expressão como kit comercial (CEREGHINO & CREGG, 2000).

P. pastoris pode crescer até atingir níveis muitos altos de densidade celular (> 130 g de peso seco celular por litro) (WEGNER, 1990) em culturas de alta densidade celular, o etanol, produto da fermentação da *S. cerevisiae*, rapidamente atinge níveis tóxicos, o qual limita o crescimento da levedura e a produção de proteínas. Por sua

preferência por crescimento respiratório, *P. pastoris* pode crescer em altos níveis e assim aumentar a produção de proteínas secretadas, visto que a concentração da proteína no meio é proporcional à concentração de células na cultura (CEREGHINO & CREGG, 2000).

O sistema de expressão em *P. pastoris* utiliza o promotor da álcool oxidase 1, rigorosamente regulado pelo metanol (COUDERE & BARATTI, 1980), o qual controla a expressão do gene que codifica a expressão da enzima álcool oxidase, a enzima que catalisa o primeiro passo no metabolismo do metanol. Ela não é detectada em células crescidas em meio com glicose, glicerol ou etanol, mas é dramaticamente induzida quando as células são transferidas para meio com metanol (ROGGENKAMP *et al.*, 1984). A expressão do gene *aox1* é controlada em nível de transcrição (THCHOPP *et al.*, 1987; CREGG *et al.*, 1989). Em células crescidas na presença do metanol, cerca de 5% do RNA poli(A) é derivado do *aox1*; entretanto, em células crescidas em meio com outras fontes de carbono, o RNA mensageiro do *aox1* não é detectado (CREGG *et al.*, 1988).

Genes heterólogos podem ser expressos em *P. pastoris* colocando-os sob controle do promotor AOX1. Isso tem se mostrado simples, fácil de ser realizado em grande escala e de custo compatível para a fermentação industrial (CREGG *et al.*, 1993).

Os vetores de expressão são integrados ao genoma da *P. pastoris* para maximizar a estabilidade das cepas. A maneira mais simples de se promover este evento é digerir o vetor de expressão em um único sítio, antes de realizar a transformação. A terminação livre do DNA estimula a ocorrência de recombinação homóloga que resulta em um evento de integração baseado em um *crossing-over* simples (CEREGHINO & CREGG, 2000).

A utilização da levedura *P. pastoris* para a produção de proteínas heterólogas tem obtido inúmeros sucesso, como por exemplo, a obtenção de 12 g/l do fragmento C da toxina tetânica (CLARE *et al.*, 1991), 10 g/l do fator da necrose tumoral, 2,5 g/l da enzima alfa amilase (PAIFER *et al.*, 1994), 2,3 g/l da enzima catalase (CALERA, *et al.*, 1997), entre outros. Algumas proteínas de superfície também foram expressas com sucesso nesta levedura (CREGG *et al.*, 1987; FRYXELL *et al.* 1995; WEISS *et al.*, 1995).

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo Geral

Clonagem e expressão do gene *ligAni* de *Leptospira interrogans* em *Pichia pastoris*.

1.5.2 Objetivos específicos

- Clonar o gene *ligAni* no vetor de expressão pPICZ B;
- Transformar *P. pastoris* com os vetores recombinantes;
- Expressar a proteína de leptospira em *P. pastoris*;
- Verificar a expressão das proteínas recombinantes;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas, cultivo e extração de DNA

A cepa de *Leptospira interrogans* Icterohemorragie Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) foi cultivada a 30°C em meio Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) enriquecidos com 10% de albumina bovina (Difco Laboratories). Para ser utilizada como DNA molde a cultura foi centrifugada a 10.000 × g, ressuspendida em solução salina 1% e fervidas por 10 minutos. A *Escherichia coli* TOP 10F (Invitrogen), foi crescida a 37°C em meio Luria-Bertani (LB) (Difco Laboratories) suplementado, quando necessário, com 25 µg/ml de zeocina ou 100 µg/ml de ampicilina. A cepa de *Pichia pastoris* KM71 (Invitrogen) utilizada como sistema de expressão, foi crescida a 30°C em meio YNB (Invitrogen) suplementado quando necessário com 100 µg/ml de zeocina.

2.2 Obtenção e preparo do gene *ligAni*

2.2.1 Síntese dos primers

A seqüência do gene *ligAni* de *L. interrogans* sorovar Copenhageni L1-130 (FIOCRUZ, BA) foi obtida no GenBank. Posteriormente, foram desenhados primers *forward* (5' CGGAATTCAATAATGTCTGATATTCTTACCGT 3') e reverso (5' TAGGTACCATGGCTCCGTTTTAATAGAG 3'), utilizando-se o programa Vector NTI 8.0 (Invitrogen), com a adição de sítios de restrição das endonucleases *EcoRI* e *KpnI*.

2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase

Com a finalidade de amplificar o gene *ligAni*, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando a enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen). As amostras foram submetidas ao programa descrito na Tabela 1, em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf).

TABELA 1. Programa utilizado para a realização da reação de PCR

Processo	Temperatura	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	94°C	3 min	1
Desnaturação	94°C	30 s	35
Anelamento	48°C	30 s	35
Extensão	72°C	1 min	35
Extensão final	72°C	7 min	1

Os componentes da reação de PCR foram combinados como descrito na Tabela 2, com volume final de 25 μ l. Como controle negativo foi realizada uma reação de PCR similar, porém os *primers* não foram substituídos por água milli-Q.

TABELA 2. Descrição de cada componente utilizado na reação de PCR.

COMPONENTES	Quantidade
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	0,2 μ l
DNTP's (10mM)	1,0 μ l
MgCl ₂	0,75 μ l
Tampão da enzima 1X	2,5 μ l
<i>Primers</i> (300 ng/ μ l)	1 μ l de cada
DNA molde	1,0 μ l
Água milli-Q	17,55 μ l

Para confirmar a amplificação do DNA, 2 μ l do produto de cada reação PCR com 2 μ l de tampão de amostra 6x e o marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen) foram aplicados em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídeo na concentração de 0,05 μ g/ml. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (BioRad) com tampão TBE a 130 volts por 35 minutos. Posteriormente os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultra-violeta.

2.2.3 Purificação dos produtos de PCR

As purificações dos produtos de PCR foram realizadas seguindo as instruções do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, UK). Inicialmente foram adicionados no tubo de microcentrifuga contendo o DNA 500 µl de tampão de captura (contendo acetato), a seguir foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor e que foi centrifugada por 1 min a 14.000 rpm. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e foi adicionado, na coluna, 500 µl de tampão de lavagem (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 0,1 mM EDTA; etanol para concentração final de 80%). A seguir o sistema foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi descartado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e nela foi adicionado 40 µl de tampão de eluição (TE 1X), deixando este sistema incubar a temperatura ambiente por 1 min. Após houve uma nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. Posteriormente, 3 µl do produto foi analisado em gel de agarose 0,8% e o DNA restante foi armazenado a – 20°C.

2.2.4 Digestão do gene *ligAni*

Para que as extremidades dos fragmentos amplificados fossem compatíveis com as extremidades dos vetores, foi realizado a digestão do gene *ligAni* com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *KpnI*.

A reação de digestão foi realizada em um volume final de 60 µl. Para tal foram utilizados 40 µl de DNA, 1 µl de cada enzima, 13 µl de água milli-Q e 6 µl do tampão de reação 10X. A reação foi incubada a 37° C, em banho-maria, por 2 h e 5 µl do produto foram analisado em gel de agarose 0,8%.

Para retirar as impurezas da digestão, foi novamente realizada a purificação do DNA plasmidial com “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, seguindo o protocolo descrito no item 2.2.3.

2.3 Clonagem do gene *ligAni* sistema TOPO TA

2.3.1 Ligação do gene *ligAni* no vetor pCR 2.1

O gene *ligAni* foi inserido no vetor pCR 2.1 utilizando-se o sistema TOPO TA de clonagem (Invitrogen) segundo instruções do fabricante. A solução de clonagem foi preparada em um tubo de microcentrifuga com a capacidade para 1,5 ml, através da mistura de 2 µl do produto de PCR, 1 µl de solução salina apropriada, 1 µl do

vetor TOPO e 2 µl de água estéril. Posteriormente, a reação ficou a temperatura ambiente por 15 minutos.

2.3.2 Preparo de células eletrocompetentes de *E. coli*

Para a realização deste procedimento, foram utilizadas células de *E. coli* cepa TOP 10 (Invitrogen) e foram preparadas para eletroporação utilizando o protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001), com algumas modificações. Uma alíquota da cultura de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen), presente na coleção de cepas do laboratório foi semeada, por esgotamento, em uma placa de LB ágar. A placa foi incubada a 37°C, por um período de 16 a 24 horas (*overnight*). Do crescimento resultante, uma colônia isolada, foi semeada em 2 ml de LB líquido e cultivado *overnight* a 37°C sob agitação de 225 rpm. Posteriormente, o cultivo foi inoculado em um frasco com a capacidade de 500 ml contendo 50 ml de meio LB líquido e cultivado a 37°C, sob agitação de 225 rpm, até a densidade óptica a 600 nm (OD₆₀₀) atingir entre 0,5 e 0,7 (aproximadamente 5×10^7). A seguir o cultivo foi transferido para tubos de centrifuga estéreis com a capacidade de 50 ml e resfriado em banho de gelo por 20 minutos, sendo centrifugado a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o *pellet* foi ressuspendido em 50 ml de água milli-Q estéril a 4°C. A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, o *pellet* ressuspendido em 25 ml de glicerol 10% estéril a 4°C, após mais uma centrifugação sob as mesmas condições foi eliminado o sobrenadante, e o *pellet* foi ressuspendido em 2 ml de glicerol 10% estéril a 4°C para cada 50 ml de meio original. As células eletrocompetentes foram fracionadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml de capacidade (alíquotas de 50 µl) e congeladas a – 70°C para posterior transformação.

2.3.3 Transformação em *E. coli*

O protocolo de transformação em *E. coli* foi preparado conforme Sambrook & Russel (2001), com algumas modificações. As células eletrocompetentes foram removidas do – 70°C e descongeladas em gelo. Para cada transformação utilizou-se 50 µl de células eletrocompetentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen) e 1 µl do produto de ligação ou DNA plasmidial. Com uma ponteira estéril foram misturadas às amostras, agitou-se gentilmente e transferiu-se para uma cubeta de eletroporação,

Gene Pulser Curvette (Bio-Rad Laboratories) de 0,2 cm de largura, gelada. Acoplada ao eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories), ajustado para as seguintes condições: 25 μ FD de capacitância, 200 Ohms de resistência e 2,5 kV de voltagem, a cubeta foi submetida ao pulso elétrico. Imediatamente após o choque elétrico 500 μ l de meio LB líquido foi adicionado à cubeta, homogeneizado e transferido para um tubo de microcentrifuga estéril com 1,5 ml de capacidade, o qual foi incubado em agitador orbital a 225 rpm a 37° C por 1 hora.

Após este período de incubação, as células transformadas foram centrifugadas em microcentrífuga a 14000 rpm por 1 min. 400 μ l do sobrenadante foram removidos e as células ressuspensas no volume restante, o qual foi depositado em placa contendo 20 ml de meio LB ágar acrescidos de 1 μ l/ml de X-Gal, 2 μ l/ml de IPTG, 50 μ g/ml de canamicina, o volume depositado sobre a placa foi espalhado por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski e posteriormente as placas foram incubadas a 37° C, *overnight*.

2.3.4 Seleção dos clones recombinantes em *E. coli*

Para a análise dos clones recombinantes em *E. coli*, primeiramente, foi realizada uma triagem rápida com fenol:clorofórmio. As colônias bacterianas foram ressuspensas em um tubo de microcentrifuga contendo 15 μ l de tampão de amostra 1x contendo 10 μ g/ml de RNase e 15 μ l de fenol:clorofórmio. O tubo de microcentrifuga foi levado ao voltex para homogeneização, centrifugado por 5 min a 14.000 rpm. Em seguida foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 0.8% com 15 μ l do sobrenadante desta reação. As colônias que apresentaram o inserto foram expandidas em meio de cultura LB líquido estéril com 50 μ g/ml de canamicina, mantidas sob agitação (225 rpm) *overnight* a 37°C, para posterior extração de DNA plasmidial.

2.3.5 Extração de DNA plasmidial de *E. coli*

A extração do DNA plasmidial foi realizada seguindo as instruções do Flexiprep™ Kit (Amershan Biosciences). Utilizando uma ponteira estéril, uma colônia de *E. coli* da placa contendo meio seletivo, foi transferida para 3 ml de meio LB e este incubado “*overnight*” sob agitação de 225 rpm a 37°C. Após foi transferido 1,5 ml da cultura para um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL e este foi centrifugado por

1 min a 14.000 rpm. A seguir o sobrenadante foi removido e o *pellet* ressuspendido em 300 µl de Solução I (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 400 µg/mL RNase) em vortex. Após foram adicionados 300 µl da Solução II (1 M NaOH, %,3% SDS) e o tubo foi invertido por 10 a 15 vezes. A seguir foram adicionados 600 µl da Solução III (potássio 3 M e acetato 5M) e o conteúdo do tubo foi homogeneizado. A solução foi centrifugada por 5 min a 14.000 rpm e o sobrenadante foi transferido para a coluna. Após 30 segundos de incubação, foi centrifugado por 1 minuto a 14.000 rpm. Adicionou-se 400 µl de tampão de lavagem e foi centrifugado sob as mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi desprezado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e nela foi adicionado 40 µl tampão de eluição pré aquecido (TE 1X), deixando este sistema incubar a temperatura ambiente por 1 min. Após houve uma nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. . Posteriormente, 1 µl do produto foi analisado em gel de agarose 0,8% para a sua quantificação e o DNA restante foi armazenado a – 20°C.

2.3.6 Digestão do TOPO/*ligAni*

O DNA plasmidial, extraído dos clones de *E. coli*, foram digeridos com as endonucleases de restrição Eco RI e Kpn I, como já descrito no item 2.2.4, para a confirmação de que este plasmídeo era realmente o TOPO/*ligAni*, e para a liberação do gene *ligAni*, que seja posteriormente utilizado para a ser ligado ao vetor de expressão pPICZ B.

2.3.7 Purificação do gene *ligAni* de gel de agarose

A extração da banda do gel de agarose que continha o gene *ligAni* foi realizada seguindo o as instruções do GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, UK). Primeiramente, utilizando um bisturi, a banda foi cortada do gel de agarose, transferida para um tubo de microcentrífuga com 500 µl de tampão de captura, e levadas ao banho-maria até que estivessem completamente dissolvidas (aproximadamente 15 min). Posteriormente, o conteúdo do tubo de microcentífuga, foi transferido para uma coluna contendo um tubo coletor e que foi centrifugada por 1 min a 14.000 rpm. O conteúdo do tubo coletor foi descartado e foi adicionado, na coluna, 500 µl de tampão de lavagem. A seguir o sistema foi centrifugado nas mesmas condições anteriores e o tubo coletor foi

descartado. A coluna foi então transferida para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e nela foi adicionado 40 µl de tampão de eluição (TE 1X), deixando este sistema incubar a temperatura ambiente por 1 min. Após houve uma nova centrifugação para que o DNA passasse da coluna para o tubo. Posteriormente, 3 µl do produto foi analisado em gel de agarose 0,8% e o DNA restante foi armazenado a - 20°C, para uma posterior clonagem deste no vetor pPICZ B.

2.4 Preparo do vetor pPICZ B

Para que a ligação do vetor de expressão pPICZ B ao inserto fosse obtida com sucesso, os plasmídios vetorais, foram também digeridos com as mesmas endonucleases de restrição utilizadas para digerir o gene *ligAni* (*EcoRI* e *KpnI*). A reação de digestão deste vetor foi realizada para um volume final de 100 µl. Para tal reação foram adicionados 60 µl do vetor, 10 µl do tampão de reação 10x, 26 µl de água milli-Q e 1 µl de cada enzima. A reação foi incubada a 37° C por 2 h.

Para evitar que ocorresse a recircularização do plasmídio, o vetor foi tratado com a enzima fosfatase alcalina (CIP). Esta enzima atua retirando fosfatos das extremidades da fita de DNA, impedindo a sua recircularização. Este procedimento consistiu em adicionar à solução do plasmídio 1 µl de enzima CIP e, incubar a amostra por 1 hora a 37° C, em banho-maria. Após foi realizada a purificação do vetor tratado com CIP com “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, seguindo o protocolo descrito no item 2.2.3.

2.5 Ligação do gene *ligAni* ao vetor de expressão

A reação de ligação do gene *ligAni* ao vetor pPICZ B foi realizada combinando-se os seguintes reagentes: 4 µl do DNA plasmidial pPICZ B, 6 µl do inserto *ligAni*, 4 µl do tampão T4 DNA ligase 5X, 1 µl da enzima T4 DNA ligase (Amersham) (1U/ µl) e 5 µl de água milli-Q, numa reação com volume final de 25 µl, a qual foi incubada a 16°C por um período de 2 h e “overnight” a 4°C.

2.6 Preparo do plasmídio pPICZ B/ligAni

2.6.1 Obtenção do plasmídio pPICZ B/ligAni

A ligação do gene *ligAni* com o vetor pPICZ B, foi utilizada para transformar *E. coli* seguindo o protocolo já descrito no item 2.3.3.. Os clones recombinantes foram selecionadas, como descrito no item 2.3.4, e foi realizado a extração do DNA plasmidial como descrito no item 2.3.5. Para obter a confirmação que os clones de *E. coli* continham o plasmídio pPICZB/ligAni, foi realizada uma digestão deste plasmídio com endonucleases de restrição *HindIII* e *XbaI* ou apenas a endonuclease de restrição *HindIII*, como descrito no item no item 2.2.4.

2.6.2 Linearização e concentração do plasmídio pPICZB/ligAni

A probabilidade de integração do DNA plasmidias ao DNA genômico da *P. pastoris* aumenta quando o plasmídio está linearizado. Para isso, foi realizado a linearização do plasmídio com a endonuclease de restrição *SacI*, pois há apenas um sítio de restrição desta enzima no vetor e nenhum dentro da seqüência do gene *ligAni*. A reação de digestão com a endonuclease de restrição *SacI* foi realizada conforme descrita no item 2.2.4, diferindo na substituição do tampão de eluição por água milli-Q para evitar a presença de sais.

2.7 Obtenção de clones recombinantes em *P. pastoris*

2.7.1 Células eletrocompetentes de *P. pastoris*

As células competentes de *P. pastoris* KM71 (Invitrogen) foram preparadas para eletroporação. Uma alicota liofilizada da cultura de *P. pastores* KM71 foi semeada, por esgotamento, em placa de YPD ágar (Invitrogen). A placa foi incubada a 30°C *overnight*. Com uma ponteira estéril, uma colônia do crescimento resultante foi semeada em 5 ml de YPD e incubada *overnight* a 30°C sob agitação de 225 rpm. Posteriormente 0,5 ml do cultivo foi inoculado em um frasco com a capacidade de 2 l com 500 ml de meio YPD e incubado sob as mesmas condições até a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) atingir entre 1,3 e 1,5. A seguir o cultivo foi transferido para tubos de centrifuga estéreis com a capacidade de 250 ml e resfriado em banho de gelo por 20 minutos, sendo centrifugado a 1.500 g por 5 minutos a 4°C. Após a centrifugação o *pellet* foi ressuspenso em 250 ml de água estéril a 4°C. A amostra foi mais uma vez centrifugada sob as mesmas condições, o *pellet* foi ressuspenso

em 50 ml de sorbitol 1M estéril a 4°C, e foi transferido para um tubo de centrífuga com a capacidade de 50 ml, sendo centrifugado sob as mesmas condições e ressuspenso com 1,0 ml de sorbitol 1M estéril a 4°C para cada 250 ml de meio original.

As células eletrocompetentes foram fracionadas em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml de capacidade (alíquotas de 80 µl) mantidas no gelo e para serem utilizadas na eletroporação que foi realizada no mesmo dia e seu preparo.

2.7.2 Transformação em *P. pastoris*

Para o processo de transformação foi misturado 80 µl de células competentes com 10 µg do plasmídeo linearizado (em 5 a 10 µl de água estéril), e transferido para uma cubeta de eletroporação (Bio-Rad Laboratories) de 0,2 cm de largura, gelada. A cubeta foi incubada por 5 minutos no gelo. Em seguida a cubeta foi acoplada ao eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad Laboratories) submetida às seguintes condições: 25 µFD da capacitância, 200 Ohms de resistência e 2,5 kV de voltagem. Imediatamente após o pulso elétrico, adicionou-se 1 ml de sorbitol 1M estéril a 4°C à cubeta. Transferiu-se o conteúdo para um tubo de 15 ml estéril, as células eletroporadas foram incubadas a 30°C sem agitação por uma hora. Após este período, foi adicionado 1 ml do meio YPD e as células passaram a ser incubadas sob agitação de 225 rpm a 30°C por mais duas horas.

Após o período de incubação 100 µl do cultivo foi plaqueado em YPDS (Invitrogen) com ágar e 100 µg/ml de zeocina e espalhados por toda a placa com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30°C até as colônias aparecerem (aproximadamente 2 dias).

2.7.3 Seleção para confirmação dos clones recombinantes

A PCR de colônia é uma forma simples de testar diretamente os clones de *P. pastoris* para verificar se o gene de interesse se integrou ao genoma da levedura (Linder 1996 Barros). Para isto, com o auxílio de uma ponteira estéril, colônias de *P. pastoris* que cresceram na placa de YPDS + zeocina após a transformação foram colocadas em um tubo com 20 µl de água milli-Q e fervidas em banho-maria durante 10 minutos para a lise das células. 2 µl deste material fervido foram utilizados numa reação de PCR com volume final de 25 µl como descrito na Tabela 3.

TABELA 3. Descrição de cada componente utilizado na reação de PCR.

COMPONENTES	Quantidade
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerase	0,4 μ l
DNTP's (10mM)	0,5 μ l
MgCl ₂	1,5 μ l
Tampão da enzima 1X	5 μ l
<i>Primers</i> (300 ng/ μ l)	1 μ l de cada
DNA molde	1,5 μ l
Água milli-Q	15 μ l

Os *primers* utilizados nesta reação e as suas condições foram os mesmos utilizados na PCR realizada para amplificação do gene *ligAni* (item 2.2.2). Gel de agarose a 0,8 % foi utilizado para confirmação da amplificação do gene *ligAni* a partir dos clones de *P. pastoris* selecionados após a transformação. Os clones selecionados foram submetidos à indução da proteína heteróloga e analisados quanto a secreção do gene *ligAni*.

2.8 Expressão da proteína *ligAni*

2.8.1 Pré-inóculo e indução

As colônias crescidas na placa de YPDS com agar e zeocina após a transformação e positiva para o PCR de colônia, além dos controles negativos (cepa KM71 não transformada, e cepa KM transformada com o vetor sem o inserto *ligAni*) foram inoculadas em 25 ml de meio BMGY em erlenmeyer de 250 ml com o auxílio de uma ponteira estéril. Os inóculos foram incubados em agitador orbital a 225 rpm a 30°C até a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) atingir entre 2 e 6 (aproximadamente 48 horas). As células foram centrifugadas a 3.000g por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado com meio BMMY para uma a densidade ótica a 600 nm (OD₆₀₀) de 1 para iniciar a indução da expressão da proteína heteróloga. O inóculo foi submetido à temperatura de 30°C e agitação de 250 rpm durante um período de 168 horas (7 dias). A cada 24 horas foi adicionado metanol 100% a uma concentração final de 0,5. Ao término das 168, uma alíquota de 1 ml do inóculo foi retirado.

2.8.2 Preparo das amostras para análise das proteínas

Cada alíquota de 1 ml do inóculo de indução foi centrifugada por 1 min a 14.000 rpm. Desprezado o sobrenadante e ressuspendido o “pellet” em 200 µl de Tris HCl pH 7,5. O conteúdo foi transferido para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml com pérolas de vidro. O tubo de microcentrifuga foi ribolizado 2 vezes de 20 segundos. Centrifugado por 5 min a uma rotação de 14.000 rpm...

Foram coletados 60 µl das amostras e adicionados a um tubo de microcentrifuga com 20 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE. Posteriormente o tubo de microcentrifuga foi fervido por 10 min.

2.8.3 Análise das proteínas por SDS-PAGE

Os níveis de expressão das proteínas recombinantes foram verificados submetendo-se às amostras à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Os géis de poliacrilamida foram preparados utilizando o sistema de mini-gel (BioRad), a concentração de 15% para o gel de separação e 5% para o gel de empilhamento conforme tabela 4 e 5.

TABELA 4. Componentes do Gel de Separação (15%) de Poliacrilamida.

COMPONENTES	Quantidade para um gel
30% Acrilamida Mix	2,5 ml
1.5 nM This (pH 8.8)	1,3 ml
10% SDS	0,05 ml
10% Persulfato de amônio	0,05 ml
TEMED	0,002 ml
Água milli-Q	1,1 ml

TABELA 5. Componentes do Gel de Empilhamento (5%) de Poliacrilamida.

COMPONENTES	Quantidade para um gel
30% Acrilamida Mix	0,17 ml
1.5 nM Tris (pH 8.8)	0,13 ml
10% SDS	0,01 ml
10% Persulfato de amônio	0,01 ml
TEMED	0,001 ml
Água milli-Q	0,68 ml

Um volume de amostra de 15-20 µl foi aplicado no gel. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 140 V e 30 mA por aproximadamente 90 minutos. Após a eletroforese, os géis que não seria feito *Western blot* foram corados com Coomassie Blue a 60°C por 15 minutos e descorados com água destilada microondas.

2.8.4 Análise das proteínas por *Western blot*

Para determinar se o gene *ligAni* foi expresso, foi realizado um *Western blot* utilizando-se anticorpo monoclonal anti-poli-histidina, o qual possui afinidade pela cauda de seis histidinas na extremidade C-terminal da proteína heteróloga. Para isto, após a eletroforese as proteínas presentes no gel de poliacrilamida, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond™ ECL™ (Amersham Biosciences). Para realizar esta transferência, um “sanduíche” foi montado na seguinte ordem: dois papéis filtro Whatman 3MM a membrana de nitrocelulose do tamanho de do gel de poliacrilamida, o gel de poliacrilamida e mais dois papéis filtro, todos saturados em tampão de transferência. O processo de transferência foi realizado em um “Bio-Rad Trans-Blotcell”. O sanduíche foi imerso dentro de uma cuba cheia de tampão de transferência, em um suporte apropriado, com o gel localizado no lado negativo. A transferência foi realizada a 150V por 1 hora. Após a transferência a membrana foi incubada por 30 minutos em 30 ml de solução bloqueadora (leite em pó 5%) para saturar ligações não-específicas na membrana. Em seguida foram realizadas 3 lavagens da membrana com PBS-T 1X por 3 min cada. A membrana foi incubada por 1 hora em 10 ml de PBS-T 1X contendo a diluição apropriada do anticorpo anti-cauda de histidina (6xHIS) conjugado com

fosfatase alcalina. O excesso de anticorpo foi removido com 3 lavagens de 3 min de PBS-T 1x. Para a revelação foram adicionadas 5 ml de Tris HCl pH 7.6 com 100 µl de cloronaftol e 10 µl de H₂O₂.

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção e preparo do gene *ligAni*

3.1.1 Amplificação do gene *ligAni*

O gene *ligAni* foi amplificado por PCR, utilizando-se *primers* com homologia às regiões flanqueadoras deste gene com a adição de sítios de restrição das enzimas *EcoRI* e *KpnI*. Este gene possui aproximadamente 1788 pb. Tal número foi compatível com o tamanho do fragmento amplificado na reação de PCR (item 2.2.2), como pode ser observado na figura 1.

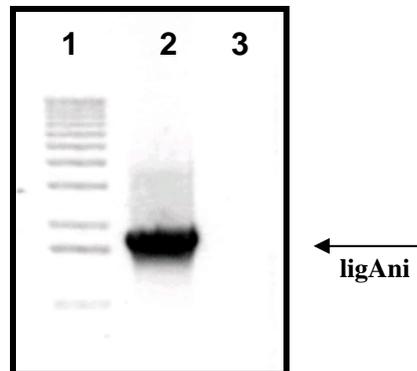


FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, dos produtos da amplificação do gene *ligAni* por PCR. **Coluna 1.** Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA Ladder; **Coluna 2.** produto do PCR (1788 pb); **Coluna 3.** controle negativo.

Analisando-se a figura acima, verifica-se que houve boa amplificação do gene *ligAni* evidenciado pela presença de uma única banda de DNA na amostra e sua ausência no controle negativo. Ao analisar a intensidade da banda se verifica que a quantidade de DNA também está dentro do esperado.

3.1.2 Digestão e purificação do gene *ligAni*

Após a PCR, os fragmentos obtidos foram purificados segundo o protocolo descrito no item 2.2.3 e a seguir, realizou-se digestão dos insertos com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *KpnI*, seguindo o protocolo descrito no item 2.2.4. Estas enzimas foram selecionadas por estarem presentes nos sítios de

clonagem no vetor de expressão a ser utilizado (pPICZB) e, ao mesmo tempo, por não existirem estes sítios de restrição dentro do gene a ser amplificada (*ligAni*).

Após a digestão, realizou-se mais uma purificação como descrito no item 2.2.3 e analisou-se 3 µl do produto em gel de agarose 0,8% (figura 2). Embora tivesse ocorrido perda de DNA durante o processo de digestão e purificação do fragmento amplificado por PCR, o material obtido no final do processo foi suficiente para a realização das etapas posteriores de clonagem, como pode ser observado na figura 2.



FIGURA 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% do gene *ligAni*, digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *KpnI* e purificado com o Kit GFX.

3.2 Clonagem do gene *ligAni* sistema TOPO TA

A ligação descrita no item 2.3.1 foi utilizada para transformar *E. coli* TOP 10 por eletroporação (item 2.3.3). Para detectar quais as colônias que apresentavam o gene *ligAni* foi realizado uma triagem rápida com fenol:clorofórmio (item 2.3.4) (figura 3). As colônias que apresentaram no gel de agarose um DNA plasmidial com um tamanho maior que o DNA plasmidial do controle (que possuía apenas o vetor) supostamente possuíam o gene *ligAni*. As colônias que apresentaram o inserto foram expandidas em meio de cultura e o seu DNA extra cromossomal foi extraído (item 2.3.5), o produto da extração plasmidial foi analisado em gel de agarose 0,8% (figura 4).

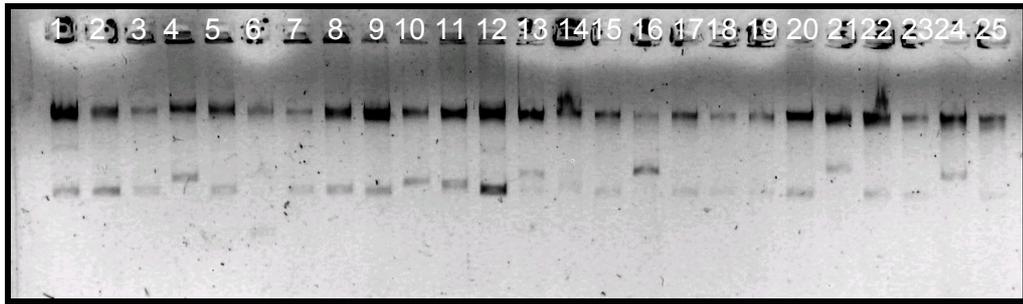


FIGURA 3: Detecção rápida de colônias com o plasmídio TOPO/*ligAni* com fenol:clorofórmio. **Colônia 1.** Controle negativo; **Colônias 4, 13, 21 e 24:** clones recombinantes; **Colônias 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 25:** clones não recombinantes

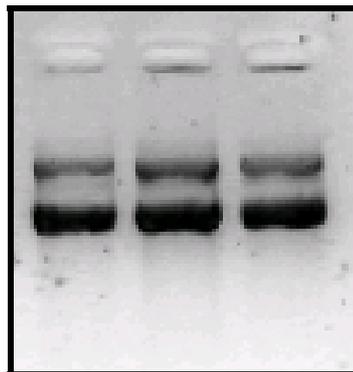


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com os produtos da extração do plasmídio TOPO/*ligAni*.

Para a liberação do gene *ligAni*, que se encontrava ligado ao vetor TOPO, o plasmídio extraído, foi submetido a uma digestão com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *KpnI* (item 2.3.6). Como o produto da digestão liberou a banda na altura esperada (vetor na altura de 3581 pb, inserto na altura de 1788 pb) todo o produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 0,8% e a banda de 1788 pb foi cortada do gel de agarose (figura 5), e a foi realizado a purificação do gene *ligAni*, presente nesta banda (item 2.3.7).

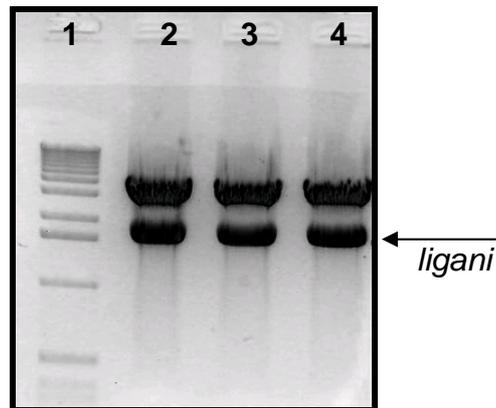


FIGURA 5 - Gel de agarose 0,8% da digestão do plasmídio TOPO/ligAni. **Coluna 1.** Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA Ladder; **Coluna 2.** Clone recombinante digerido com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *KpnI*.

3. 3 Preparo do Vetor pPicZ B

O vetor de expressão em *P. pastoris* pPICZ B possui múltiplos sítios de clonagem com 10 sítios de restrição únicos que permitem uma eficiente inserção do gene no vetor de expressão. Este vetor possui também uma cauda de polihistidina C-terminla que permite a detecção da proteína de fusão através de anticorpos anti-His tag e a purificação através de resina de níquel, além de um gene de resistência a zeocina. As características deste vetor de expressão estão sumarizadas na figura 6.

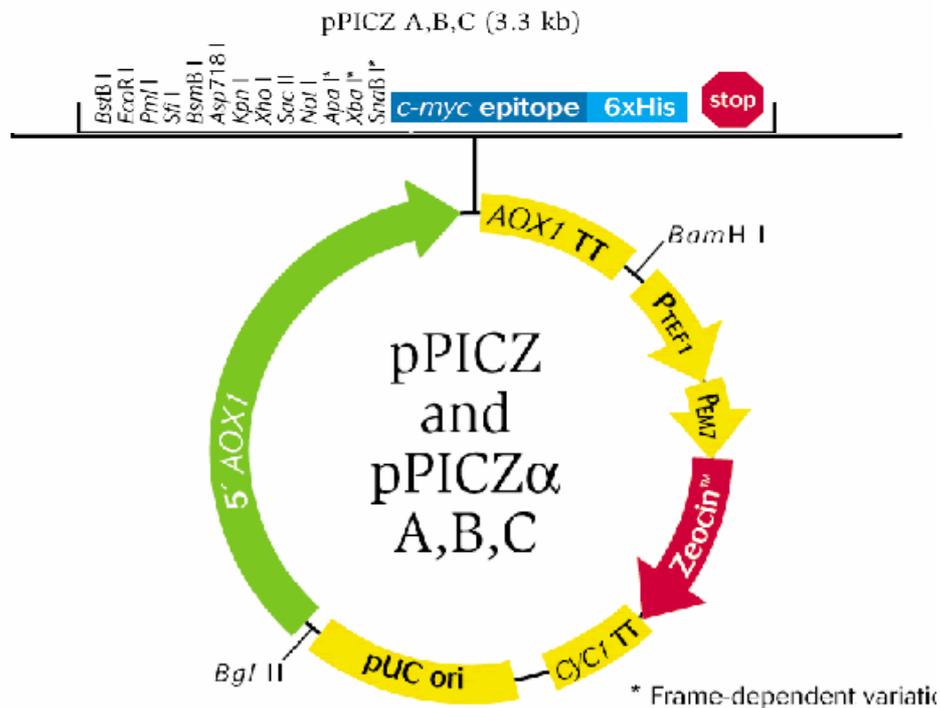


FIGURA 6: Mapa do vetor de expressão pPICZB, mostrando a origem de replicação em *E. coli*, pUC; fragmento contendo o promotor AOX1; região de múltiplos sítios de clonagem; myc epitopo tag para detecção da proteína através de anticorpos; cauda de 6x Histidina para detecção e purificação da proteína; terminador de transcrição AOX1 TT; promotor de *transcription elongation factor 1* (TEF1) que dirige a expressão do gene de resistência a zeocina, e terminador de transcrição CYC1 de *S. cerevisiae*.

Inicialmente realizou-se digestão do vetor pPICZB com as mesmas endonucleases de restrições utilizadas na clonagem do gene *ligAni* (figura 7). Após, fez-se o tratamento do vetor digerido com a enzima fosfatase alcalina (CIP), ambos seguindo a metodologia descrita no item 2.4. Para remoção das enzimas, e de outras impurezas, realizou-se purificação do vetor como “GFX™ PCR DNA and Band Purification Kit”.

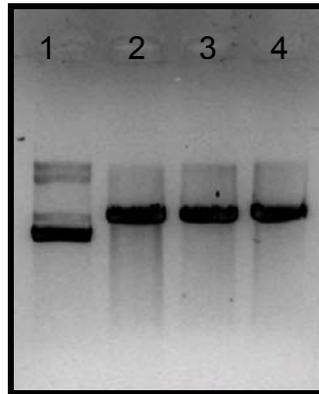


FIGURA 7: Eletroforese em gel de agarose 0,8%. Digestão com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *KpnI* do vetor pPICZB. **Coluna 1.** Vetor não digerido. **Coluna 2.** Vetor digerido com as endonucleases *EcoRI* e *KpnI*.

3.4 Construção do plasmídeo pPICZB/*ligAni*

O esquema de construção deste plasmídeo encontra-se na figura 8.

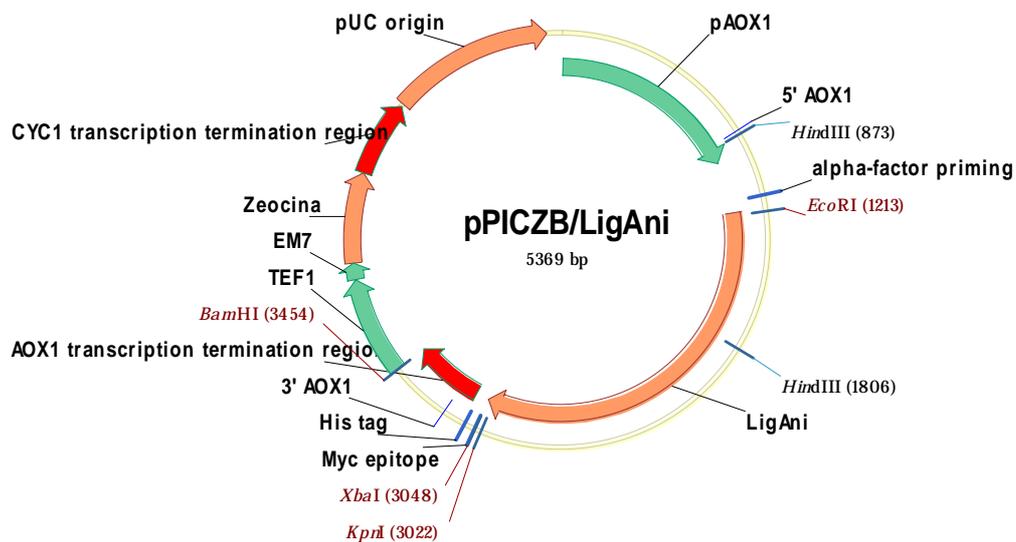


FIGURA 8: Desenho esquemático do vetor pPICZB/*ligAni* gerado pelo software VectorNTI 8.0 (Informax).

A ligação descrita no item 2.5 foi utilizada para transformar *E. coli* TOP 10 por eletroporação (item 2.2.3). Para detectar quais as colônias que apresentavam o gene *ligAni* ligado ao vetor pPICZB foi realizado uma triagem rápida com fenol:clorofórmio (item 2.3.4) (figura 9). As colônias que apresentaram no gel de agarose um DNA plasmidial com um tamanho maior que o DNA plasmidial do controle (que possuía apenas o vetor) supostamente possuíam o gene *ligAni*.

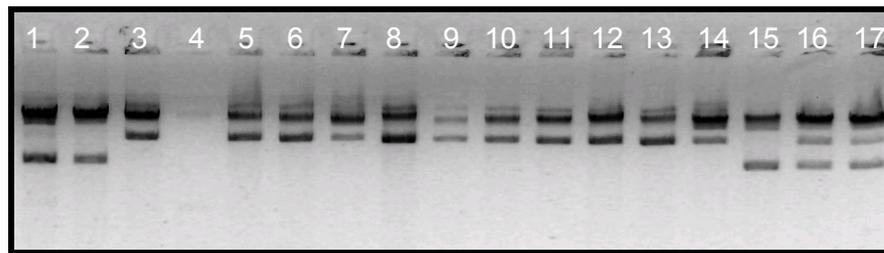


FIGURA 9: Detecção rápida de colônias com o gene *ligAni* com fenol:clorofórmio. **Colônia 1.** Controle negativo; **Colônias 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14:** clones recombinantes; **Colônias 2, 15, 16, 17:** clones não recombinantes.

Uma das colônias, que apresentaram DNA plasmidial maior que o DNA plasmidial do controle, foi cultivada e submetida à extração de DNA plasmidial (figura 10).

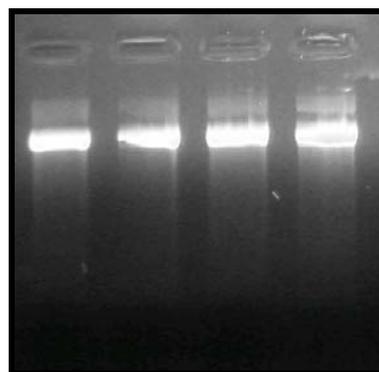


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose 0,8 % com a extração do plasmídios pPICZ B/*ligAni*.

Para comprovar que este plasmídio era composto pelo vetor pPICZB e pelo gene *ligAni*, o clone foi submetido a duas clivagens com enzimas de restrição. A

primeira foi realizada somente com a endonuclease de restrição *HindIII* e a segunda com as endonucleases de restrição *HindIII* e *XbaI*. Nas duas clivagens o clone apresentou todas as bandas nas alturas esperadas no gel de agarose 0,8% (figura 11). Visto que apresentou duas bandas (uma na altura de 4449 pb e outra na altura de 920 pb) quando digerido somente com a endonuclease *HindIII* e 3 bandas (uma na altura 3215 pb, outra na altura de 1234 pb e uma última banda na altura de 920) quando digerido com as endonucleases *HindIII* e *XbaI*.

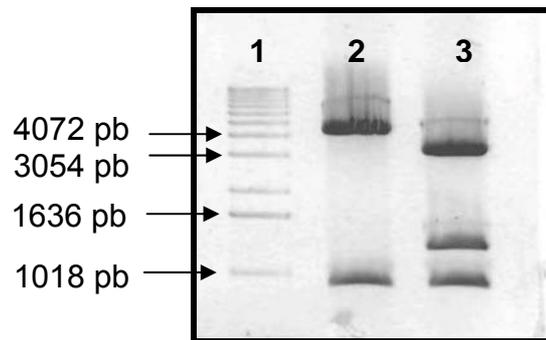


FIGURA 11. Gel de agarose 0,8% das digestão com enzimas de restrição. **Coluna 1.** Marcador de Massa Molecular 1 kb DNA Ladder; **Coluna 2.** Clone recombinante digerido com *HindIII*. **Coluna 3.** Clone recombinante digerido com *HindIII* e *XbaI*.

Após a confirmação da presença do gene *ligAni* ligada ao vetor pPICZ B, o plasmídeo recombinante foi digerido com a enzima *SacI* para a sua linearização (figura 12).

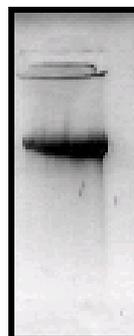


FIGURA 12. Gel de agarose 0,8% da digestão do plasmídeo recombinante pPICZ B/*ligAni* com a enzima de restrição *SacI*.

3.5 Transformação em *Pichia pastoris* KM 71

O plasmídio recombinante extraído de *E. coli* e linearizado com a enzima *Sac I* foi utilizado para transformar *P. pastoris* KM 71 eletrocompetentes (item 2.7.2). As colônias recombinantes foram utilizadas como DNA molde para um “PCR screening” para verificar a presença do inserto (figura 10).

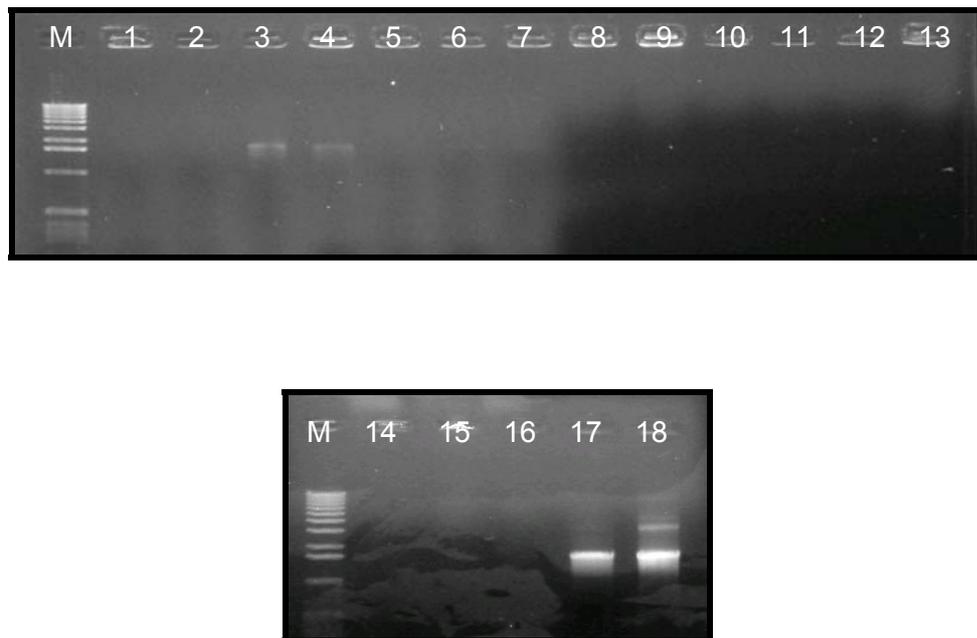


FIGURA 13. Gel de agarose 0,8% do PCR screening; **M.** Marcador de Massa Molecular 1kb DNA ladder. **Colunas 3 e 4:** clones que amplificaram no PCR de colônia. **Colunas 1, 2 e de 5 a 16:** clones que não amplificaram no PCR de colônia. **Coluna 17.** Controle negativo. **Colunas 18 e 19:** controles positivos.

Analisando a figura acima pode se observar que das 15 colônias que cresceram na placa contendo YBDS com agar e zeocina somente 2 delas foram positivas para o PRC de colônia. Entretanto estas apresentaram uma banda única e de tamanho correspondente ao esperado. No controle negativo não ocorreu a amplificação e no controle positivo houve a amplificação da banda na altura esperada. Apenas os 2 clones que foram positivos para o PCR de colônia foram inoculados para a indução da expressão de proteínas.

3.6 Expressão das proteínas recombinantes

Os vetores transformados em *P. pastoris* permitem a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a seis resíduos de histidina em sua porção C-terminal. A expressão foi realizada seguindo o protocolo descrito no item 2.8. O resultado da expressão de proteínas foi analisado através de um gel de poliacrilamida (figura 14).

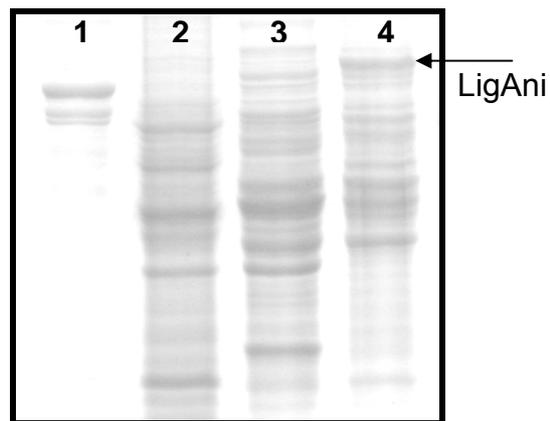


FIGURA 14. Gel de poliacrilamida a 15% corado com azul de Coomassie Blue mostrando a expressão da proteína ligAni. **Coluna 1.** Proteína LigAni purificada a partir de *E. coli*. **Coluna 2.** *Pichia pastoris* KM 71. **Coluna 3.** *P. pastoris* KM 71 com o pPICZB. **Coluna 4.** *P. pastoris* KM 71 com o pPICZB/ligAni.

3.7 Western blot da proteína LigAni

A expressão da proteína recombinante LigAni, foi confirmado através de *Western blot* utilizando anticorpo anti-cauda poli-histidina conjugado com peroxidase (Sigma), na diluição 1:3000, que na membrana de nitrocelulose, reconheceu bandas na altura esperada, devido a presença da cauda de histidina da proteína. Porém, não foi reconhecido nenhuma banda significativa nos controles somente com a cepa KM 71 e com a cepa transformada só com o vetor. Estes resultados podem ser visualizados na Figura 15.

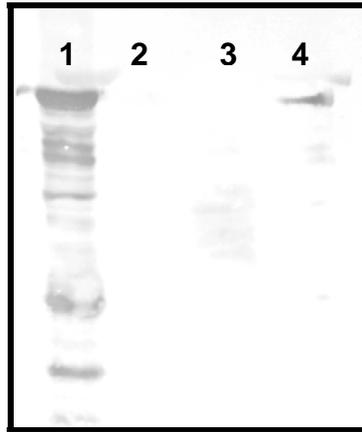


FIGURA 15 - “Western blot” de transformantes expressando o gene *ligAni* **Coluna 1.** Proteína *LigAni* purificada a partir *E. coli*. **Coluna 2.** *Pichia pastoris* KM 71 não transformada. **Coluna 3.** *P. pastoris* KM 71 somente com o vetor pPICZB. **Coluna 4.** *P. pastoris* KM 71 com o inserto pPICZB/*ligAni*.

4. DISCUSSÃO

A leptospirose é uma zoonose de ampla distribuição mundial. Os prejuízos em termos de saúde pública, e as perdas econômicas causadas por tal zoonose, justificam o uso de vacinas contra leptospirose em humanos ou em população animal de risco. Em vista disto, inúmeros esforços estão sendo empregados no desenvolvimento de vacinas produzidas a partir de antígenos conservados entre os diversos sorovares ou que possam conferir proteção cruzada.

Dados preliminares indicam o potencial das proteínas Lig no desenvolvimento de vacinas recombinantes contra leptospirose por se tratarem de proteínas de membrana externa. Ainda, dentre os membros desta família, a proteína LigB é a única que encontra-se presente entre todos os sorovares de leptospirosas patogênicas, porém com moderada conservação. Por outro lado a proteína LigA, a qual se faz presente entre todos os sorovares das espécies *Leptospira interrogans* e *Leptospira kirschneri* apresenta uma identidade superior a 83% o que a sugere como um alvo em potencial para o desenvolvimento de uma vacina comum a estas duas espécies (CERQUEIRA, 2006). Anteriormente foi demonstrado que a expressão destas proteínas ocorre somente durante a infecção (MATSUNAGA *et al.*, 2003; KOIZUMI & WATANABE, 2004). Estes dados demonstram a possibilidade de participação das proteínas Lig na proteção de amplo espectro. Para este fim, é necessário investigar diferentes alternativas de se produzir estas proteínas na sua forma recombinante de maneira que potencialize seu papel protetor e inclusive sua produção “*in vitro*” por: (i) aproximar a estrutura da proteína recombinante daquela no seu estado nativo; (ii) utilizar sistemas de expressão que forneçam a possibilidade de modificações pós-traducionais e (iii) possibilitar a produção da proteína em larga-escala como uma forma de viabilizar uma possível produção industrial.

Neste trabalho foi construído o vetor de expressão pPICZ B em *E. coli*, para uma posterior inserção na levedura *Pichia pastoris*, contendo a porção não-idêntica do gene ligA (ligAni) de *Leptospira interrogans* e foi analisada a sua expressão, uma vez que este antígeno já demonstrou ter um forte potencial como antígeno vacinal (PALANIAPPAN *et al.*, 2006). Os plasmídeos recombinantes foram caracterizados e induzidos em *P. pastoris* com a finalidade de se analisar a tradução da região não idêntica da proteína LigA. A expressão de tal proteína recombinante retornou um

produto com o tamanho idêntico àquele apresentado pela mesma proteína quando expressa a partir de *Escherichia coli*. Entretanto, a sua expressão usando *P. pastoris* não foi significativamente maior dos que aquela detectada em *E. coli*. Além disso, sua expressão foi direcionada para o meio intracelular, o que dificultará uma futura purificação desta proteína, apesar dela possuir uma cauda composta por seis resíduos de histidina. Isto se deve ao fato de haver uma quantidade muito grande de outras proteínas naturais de *P. pastoris* no meio intracelular. Esta situação pode ser contornada se futuramente esta expressão for direcionada para o exterior da célula na sua forma secretada. Dessa forma, o trabalho de purificação desta proteína se tornará mais fácil e menos oneroso, tendo em vista que a proteína recombinante seria uma das poucas proteínas a ser secretadas por esta levedura.

Diversas proteínas de *Leptospira* já foram expressas com sucesso (HAAKE *et al.* 1999; HAAKE *et al.* 2000; PALANIAPPAN *et al.* 2004). Entretanto, até o momento, não há relato de expressão de proteínas de *Leptospira* em *P. pastoris*. O sistema de expressão mais utilizado nestes casos é *E. coli*, pela fácil manipulação. Este é um organismo unicelular e sua simplicidade faz dele barato e fácil de trabalhar. Seu ciclo permite dobrar seu número de células em apenas uma hora. Assim como outras bactérias, além do seu próprio DNA circular, *E. coli* pode possuir uma molécula de DNA plasmidial, como elemento genético acessório. Os plasmídios são fáceis de isolar e manipular. Entretanto, esta bactéria também possui algumas desvantagens: *E. coli* não apresenta a maioria das organelas encontradas em eucariotos, nas quais as proteínas são modificadas após a sua síntese. Algumas destas modificações pós-traducionais podem envolver diferentes formas de glicosilação. Várias proteínas podem ser produzidas em grande quantidade em *E. coli*. Porém, por não sofrerem as modificações pós-traducionais, permanecem não-funcionais. Esta bactéria também pode gerar um “*fold*ing” incorreto da proteína, acarretando ausência de epítopos conformacionais requeridos na produção de anticorpos neutralizantes e protetores no hospedeiro. (SWARTZ, 2001).

Como as leveduras combinam fácil manipulação genética e crescimento rápido, característicos dos procariotos, com a maquinaria celular necessária para realizar as modificações pós-traducionais das células eucarióticas (CEREGHINO & CREGG, 2000), elas surgem como um bom modelo capaz de, na maioria dos casos, expressar proteínas de interesse em larga-escala e na sua forma funcional (CLARE

et al., 1991; PAIFER *et al.*, 1994; CALERA, *et al.*, 1997). Um organismo alternativo para a produção de proteínas heterólogas tem sido a levedura *Pichia pastoris*, que é capaz de realizar modificações pós-traducionais, e permite que o vetor de expressão AOX1 seja integrado ao seu genoma, maximizando a estabilidade das cepas, e permitindo que este forte promotor controle a expressão de proteínas recombinantes.

Com base nas informações sobre a levedura *P. pastoris* e nos dados sobre a proteína expressa, a qual compreende a região não-idêntica da proteína LigA, é possível concluir que o sistema testado atende aos objetivos deste estudo, o que inclui a avaliação de outros sistemas de expressão. Fica agora a necessidade de se avaliar a expressão da proteína recombinante mencionada, de forma a ser secretada pelas células de *P. pastoris*. Acredita-se que tal evento levaria tanto a uma otimização do processo de obtenção quanto à pureza da proteína recombinante, o que seria de grande valia para a futura utilização em larga-escala deste antígeno e ainda para a sua manutenção como uma proteína estruturalmente semelhante àquela encontrada na sua forma nativa.

4. CONCLUSÃO

- A região não-idêntica do gene *ligA* foi satisfatoriamente clonada e a proteína recombinante foi expressa de maneira eficiente na cepa KM 71 de *P. pastoris*.

REFERÊNCIAS

- BABIUK, L.A. (1999) Broadening the approaches to developing more effective vaccines. **Vaccine**. 17, 1587-1595.
- BABIUK, L. A., BABIUK, S. L., LOEHR, B. I., & LITTEL-VAN DEN HURK, S. V. (2000) Nucleic acid vaccines: research tool or commercial reality. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 76, 1-23.
- BARCELLOS C., LAMMERHIRT C. B., DE ALMEIDA M. A. & DOS S. E. (2003) Spatial distribution of leptospirosis in Rio Grande do Sul, Brazil: recovering the ecology of ecological studies. **Cadernos de Saúde Pública**. 19, 1283-1292.
- BINDER, W. D.; MERMEL, L. A. (1998) A leptospirosis in an urban setting: case report and review of an emerging infectious disease. **The Journal of Emergency Medicine**. 16, 851-856.
- BOLIN C. A. & ALT D. P. (2001) Use of a monovalent leptospiral vaccine to prevent renal colonization and urinary shedding in cattle exposed to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo. **American Journal of Veterinary Research**. 62, 995-1000.
- BHARADWAJ R. (2004) Leptospirosis - a reemerging disease? **Indian Journal Medical Research**. 120, 136-138.
- CERQUEIRA G. M. **Caracterização de *Leptospira* spp. quanto à presença e conservação dos genes da família *lig*: importantes alvos para utilização em vacina e testes de diagnósticos**. (2006) 56 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 53p.
- CALERA, J. A.; PARIS, S.; MONOD, M.; HAMILTON, A. J.; DEBEAUPUIS J.; DIAQUIN, M.; LÓPEZ-MEDRANO, R.; LEAL F.; LATGÉ, J. (1997) Cloning and Disruption of the Antigenic Catalase Gene of *Aspergillus fumigatus*. **American Society of Microbiology**. 65, 4718-4724.
- CEREGHINO, L. J.; CREGG, J. M. (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**. 24, 45-66.
- CICERONI, L.; PINTO, A.; BENEDETTI, E.; PIZZACARO, P.; LUPIDI, R.; CINCO, M.; GELOSA, L.; GRILLO, R.; RONDINELLA, V.; MARCUCCIO, L. (1995) Human leptospirosis in Italy. **Eur J Epidemiol**. 11, 1986-1993.
- CLARE, J. J.; RAYMENT, F. B.; BALLANTINE, S. P.; SREEKRISHNA, K.; ROMANOS M. A. (1991) High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. **Biotechnology**. 9, 455-460.
- CLARK, T. G.; CASSIDY-HANLEY, D. (2005) Recombinant Subunit Vaccines: Potential and Constraints. **Fish Vaccinology**. 121, 153-163.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agricultural and Biological Chemistry**. 44, 2279-2289.

CREGG, J. M.; MADDEN, K.R. (1988) Development of methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production foreign proteins. **Developments in Industrial Microbiology**. 29, 33-41.

CREGG, J.M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P.; STILLMAN C. A.; (1989) Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and Cellular Biology**. 9, 1316-1323.

CREGG, J. M.; TSCHOPP, J. F.; STILLMAN, C.; SIEGEL, R.; AKONG, M.; CRAIG, W. S.; BUCKHOLZ, R. G.; MADDEN, L. R.; KELLARIS, P. A.; DAVIS, G. R.; SMILEY, B. L.; CRUZ, J.; TORREGROSSA, R.; VELICELEBI, G.; THILL, G. P. (1987) High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Biotechnology**. 5, 479-485.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, 11, 905-910.

ELLIS, W.A.; HOVINDHOUGEN, K.; MOLLER, S.; BIRCHANDRESEN, A.;(1983) Morphological-Changes Upon Subculturing of Freshly Isolated Strains of *Leptospira interrogans* Serovar Hardjo. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Series A-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology**. 255, 323-335,

ELLIS, R.W. (1999) New Technologies for making vaccines. **Vaccine**. 17, 1596-1604.

FAINE S., ADLER B., BOLIN C. A. & PEROLAT P. (1999) ***Leptospira and leptospirosis***. 2nd edition, Melbourne, Australia. 272p.

FARR, R.W. (1995) Leptospirios – state-of-art clinical article. **Clin. Infect. Disc., Chicago**. 2, 1-8.

FARRAR WE.(1990) *Leptospira* species (leptospirosis). In: Mandell GL, Douglas Jr RG, Bennet JE, editors. Principles and practice of infectious diseases. 3rd edition. New York: Churchill Livingstone. 1813-1816.

FRYXELL, K. B.; O'DONOGHUE, K.; GRAEFF, R. M.; LEE, H. C; BRANTON, D.; (1995) Functional Expression of Soluble Forms of Human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. 6, 329-336

GAMBERINI, M., GÓMEZ, R.M., ATZIGEN, M.V., MARTINS, E.A.L., VASCONCELLOS, S.A., ROMERO, E.C., LEITE, L.C.C., HO, P.L., NASCIMENTO, A.L.T.O. (2005) Whole-genome analysis of *Leptospira interrogans* to identify potential vaccine candidates against leptospirosis. **FEMS Microbiology letters**. 24, 305-313.

GOLDSTEIN, S. F.; CHARON, N. W. (1990). Multiple-exposure photographic analysis of motile spirochete. **Proc Natl Acad Sci**.

HAAKE, D. A.; MAZEL, M. K.; MCCOY, A. M.; MILWARD, F.; CHAO, G.; MATSUNAGA, J.; WAGAR, E. A. (1999). Leptospiral outer membrane proteins OmpL1 and LipL41 exhibit synergistic immunoprotection. **Infection and Immunity**. 67, 6572-6582.

HAAKE, D. A., CHAO, G., ZUERNER, R. L., BARNETT, J. K., BARNETT, D., MAZEL, M., MATSUNAGA, J., LEVETT, P. N., & BOLIN, C. A. (2000). The leptospiral major outer membrane protein LipL32 is a lipoprotein expressed during mammalian infection. **Infection and Immunity**. 68, 2276-2285.

HAAKE, D. A., & J. MATSUNAGA. (2002). Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. **Infection and Immunity**. 70, 4936-4945.

HAAKE, D. A., M. A. SUCHARD, M. M. KELLEY, M. DUNDOO, D. P. ALT, & R. L. ZUERNER. (2004). Molecular evolution and mosaicism of leptospiral outer membrane proteins involves horizontal DNA transfer. **Journal of Bacteriology**. 186, 2818-2828

IKOEV V. N., GORBUNOV M. A., VACHAEV B. F., IAGOVKIN E. A., KONDRATENKO V. F., ANAN'INA I., ANSIMOVA T. I., KOSTINA N. I., IUR'EVA I. L. & NIKITIN M. G. (1999) [The evaluation of the reactogenicity and immunogenic activity of a new concentrated inactivated leptospirosis vaccine]. **Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii**, 39-43.

KO A. I., GALVAO R. M., RIBEIRO DOURADO C. M., JOHNSON W. D., JR. & RILEY L. W. (1999) Urban epidemic of severe leptospirosis in Brazil. Salvador Leptospirosis Study Group. **Lancet**, 354, 820-825

KOIZUMI, N. & WATANABE, H. (2004). Leptospiral immunoglobulin-like proteins elicit protective immunity. **Vaccine** 22, 1545-1552.

KREUZER, H.; MASSEY, A. (2002) **Engenharia Genética e Biotecnologia**. 2^a ed., Porto Alegre: Artmed, 434 .

LANGONI, H. (1999) Leptospirose: aspectos de saúde animal e saúde pública. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**. 2, 52-58.

LEVETT P. N. (2001) Leptospirosis. **Clinical Microbiology Reviews**, 14, 296-326.

LILJEQVIST, S.; STAHL, S. (1999) Production of recombinant subunit vaccines: protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. **J Biotechn**. 73, 1-33.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiol Rev**. 60, 521-538, 1996.

MARTINEZ S. R., PEREZ S. A., BARO S. M., ALVAREZ A. M., MENENDEZ H. J., DIAZ G. M., CRUZ D. L. P., DE LOS R. G., MONTOYA B. B., SIERRA G. G., ARMESTO D. R., SALTAREN C. A. & SABOURNIN R. O. (2000) Evaluation of the effectiveness of a new vaccine against human leptospirosis in groups at risk. **Revista Panamericana de Salud Publica**. 8, 385-392.

MARTINEZ, R.; PEREZ, A.; QUINONES, M. C.; CRUZ, R.; ALVAREZ, A.; ARMESTO, M.; FERNANDEZ, C.; MENENDEZ, J.; RODRIGUEZ, I.; BARO, M.; DIAZ, M.; RODRIGUEZ, J.; SIERRA, G.; OBREGON, A. M.; TOLEDO, M. E.; FERNANDEZ, N. (2004) Efficacy and safety of a vaccine against human leptospirosis in Cuba. **Revista Panamericana Salud Publica**. 15, 249-255.

MATSUNAGA, J., BAROCCHI, M. A., CRODA, J., YOUNG, T. A., SANCHEZ, Y., SIQUEIRA, I., BOLIN, C. A., REIS, M. G., RILEY, L. W., HAAKE, D. A., & KO, A. I. (2003). Pathogenic *Leptospira* species express surface-exposed proteins belonging to the bacterial immunoglobulin superfamily. **Molecular Microbiology** 49, 929-945.

MATSUNAGA, J., SANCHEZ, Y., XU, X., AND HAAKE, D.A. (2005) Osmolarity, a key environmental signal controlling expression of leptospiral proteins LigA and LigB and the extracellular release of LigA. **Infection and Immunity**. 73, 70-78.

McBRIDE, A.J.A., ATHANAZIO, D.A., REIS, M.G., KO, A.I. (2005). Leptospirosis. **Current opinion in infectious diseases**. 18: 376-386.

NASCIMENTO A. L., VERJOVSKI-ALMEIDA S., VAN SLUYS M. A., MONTEIRO-VITORELLO C. B., CAMARGO L. E., DIGIAMPIETRI L. A., HARSTKEERL R. A., HO P. L., MARQUES M. V., OLIVEIRA M. C., SETUBAL J. C., HAAKE D. A. & MARTINS E. A. (2004) Genome features of *Leptospira interrogans* serovar Copenhageni. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 37, 459-477.

PAIFER, E.; MARGOLLES, E.; CREMATA, J.; MONTESINO, R.; HERRERA, L.; DELGADO, J. M. (1994) Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylase in *Pichia pastoris* using two different signal sequences. **Yeast**. 10, 1415-1419.

PALANIAPPAN R. U., CHANG Y. F., JUSUF S. S., ARTIUSHIN S., TIMONEY J. F., MCDONOUGH S. P., BARR S. C., DIVERS T. J., SIMPSON K. W., MCDONOUGH P. L. & MOHAMMED H. O. (2002) Cloning and molecular characterization of an immunogenic LigA protein of *Leptospira interrogans*. **Infection and Immunity**. 70, 5924-5930.

PALANIAPPAN, R. U. M., CHANG, Y. F., HASSAN, F., MCDONOUGH, S. P., POUGH, M., BARR, S. C., SIMPSON, K. W., MOHAMMED, H. O., SHIN, S., MCDONOUGH, P., ZUERNER, R. L., OU, J. X., & ROE, B. (2004). Expression of leptospiral immunoglobulin-like protein by *Leptospira interrogans* and evaluation of its diagnostic potential in a kinetic ELISA. **Journal of Medical Microbiology**. 53, 975-984.

PALANIAPPAN R.U ., CHANG Y.F ., CHANG C.F ., PAN M.J ., YANG C.W ., HARPENDING P ., MCDONOUGH S.P ., DUBOVI E ., DIVERS T ., QU J ., ROE B .

(2005). Evaluation of lig-based conventional and real time PCR for the detection of pathogenic leptospire. *Molecular and Cellular Probes*. 19, 111-117.

PALANIAPPAN, R. U. M.; McDONOUGH, S. P.; DIVERS, T. J.; CHEN, C.; PAN M. MATSUMOTO, M.; CHAMG, Y.; (2006) Immunoprotection of Recombinant *Leptospira* Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* Serovar Pomona Infection. **Infection and Immunity**. 74, 1745-1750.

PETERSEN, A. M., BOYE, K., BLOM, J., SCHLICHTING, P., & KROGFELT, K. A. (2001) First isolation of *Leptospira fainei* serovar Hurstbridge from two human patients with Weil's syndrome. **Journal of Medical Microbiology**, 50, 96-100.

RAMADAS P., JARVIS B. D., CORNER R. J., PENNY D. & MARSHALL R. B. (1992) Genetic characterization of pathogenic *Leptospira* species by DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 42, 215-219.

REN S. X., FU G., JIANG X. G., ZENG R., MIAO Y. G., XU H., ZHANG Y. X., XIONG H., LU G., LU L. F., JIANG H. Q., JIA J., TU Y. F., JIANG J. X., GU W. Y., ZHANG Y. Q., CAI Z., SHENG H. H., YIN H. F., ZHANG Y., ZHU G. F., WAN M., HUANG H. L., QIAN Z., WANG S. Y., MA W., YAO Z. J., SHEN Y., QIANG B. Q., XIA Q. C., GUO X. K., DANCHIN A., SAINT G., I, SOMERVILLE R. L., WEN Y. M., SHI M. H., CHEN Z., XU J. G. & ZHAO G. P. (2003) Unique physiological and pathogenic features of *Leptospira interrogans* revealed by wholegenome sequencing. **Nature**, 422, 888-893.

ROGGENKAMP, R.; JANWIEZ, Z.; STANIKOWSKI, B; HOLLENBERG, C. P. (1984) Biosynthesis and regulation of the peroxisomal methanol oxidase from the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **Molecular & geral genetics**. 194, 489-493.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001). *Molecular Cloning – A laboratory Manual*. ed. Cold Spring Harbor, New York.

SÁNCHEZ, R. M.; FUENTES, A. M. O.; SIERRA A. P.; GIL, A. B; GONZÁLEZ, M. D.; SUÁREZ, M. B.; CAPOTE, R. M.; PÉREZ, A. R.; GONZÁLEZ, G.S.; CHÁVEZ, A. U. L. (1998) Reactogenicidad e inmunogenicidad de la primera vacuna cubana contra la leptospirosis humana. **Rev Cub Med Trop**. 50, 159-166.

SILVA, C. L. (1997). Vacinas gênicas. O impacto sobre o controle das doenças infecciosas. **Biociencia & Desenvolvimento** 3, 32-34.

SMYTH, J. A.; FITZPATRICK, D. A.; ELLIS, W. A. (1999) Stillbirth/perinatal weak calf syndrome: a study of calves infected with *Leptospira*. *Vet. Rec.* **145**:539–542

SMYTHE L. D., SMITH I. L., SMITH G. A., DOHNT M. F., SYMONDS M. L., BARNETT L. J. & MCKAY D. B. (2002) A quantitative PCR (TaqMan) assay for pathogenic *Leptospira* spp. **BMC Infectious Diseases**, 2, 13

SONRIER, C.; BRANGER, C.; MICHEL, V.; RUVOEN-CLOUET, N.; GANIERE, J. P.; ANDRE-FONTAINE, G. (2000) Evidence of cross-protection within *Leptospira interrogans* in an experimental model. *19*(1), 86-94.

SREEKRISHNA, K.; NELLES, L.; POTENZ, R.; CRUZE, J.; MAZZAFERRO, P.; FISH, W.; FUKU, M.; HOLDEN, K.; PHELPS, D.; WOOD, P. (1989) High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biochemistry** 28 (9), 4117-4125.

STOVER, C. K., DELACRUZ, V. F., FUERST, T. R., BURLEIN, J. E., BENSON, L. A., BENNETT, L. T., BANSAL, G. P., YOUNG, J. F., LEE, M. H., HATFULL, G. F., SNAPPER, S. B., BARLETTA, R. G., JACOBS, W. R., & BLOOM, B. R. (1991) New Use of BCG for Recombinant Vaccines. **Nature** 351, 456-460.

SULLIVAN, N. D. (1974) Leptospirosis in animals and man. **Australian Veterinary Journal**. 12, 216-233.

SWARTZ, J. R. (2001) Advances in *Escherichia coli* Production of Therapeutic Proteins. **Current Opinion in Biotechnology**. 12, 195-201

SZALKA A. & BINDER L. (1974) [A rare case of human-to-human infection of leptospirosis]. **Orvosi Hetilap**, 115, 1531-1532.

TSCHOPP, J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R. (1987) Expression of the LacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic acids research**. 15, 3859-3876.

VAN KAMPEN, K.R. (2001) Recombinant vaccine technology in veterinary medicine, **Vet Clin North Am**. 31, 535-538.

VASCONCELLOS, S. A., ARSKY, M. L, PEREIRA, J. J., and CCASCARDO, E., (1994) Leptospirose. Brasília: Ministério da Saúde, F. N. S. 3ed, 213-222.

VASCONCELLOS, S. A., ARSKY, M. L, PEREIRA, J. J., and CCASCARDO, E., (1998) Leptospirose. Brasília: Ministério da Saúde, F. N. S. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica** 4ed, 213-222.

VINETZ J. M. (2001) Leptospirosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 14, 527-538.

WEGNER, G. (1990) Emerging application of methylotrophic yeast. **FEMS Microbiology Reviews**. 87, 279-284

WEISS, H. M.; HAASE, W.; MICHEL, H.; REILÄNDER H.; (1995) EXPRESSION OF FUNCTIONAL mouse 5-HT_{2A} serotonin receptor in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*: pharmacological characterization and localization. **FEBS Letters**. 377, 451-456.

ZHUO, J. T.; WANG, S. S.; LAN, W. L.; (1995) A discussion on setting up target age group for immunization against leptospirosis. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.** 24, 33-42.

ZUENER, R.; HAAKE, D.; ADLER, B.; SEGERS, R.; (2000) Technological Advances in the Molecular Biology of *Leptospira*. **Jornal of Molecular Microbiology and Biotechnology.** 2, 455-462.